Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Gießen
(Direktor Professor A. W. Fischer)

Lane Medical Library
STANFORD UNIVERSITY
JUL 26 1939
LIBRARY

Über die klinische Brauchbarkeit verschiedener Verfahren zur Ermittlung des Lipasegehaltes im Blutserum

---

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Hessischen Ludwigs-Universität
zu Gießen

vorgelegt von

Wilhelm Nordeck
aus Bülowsheide (Westpreußen)

Gießen 1938

Druck genehmigt durch die Medizinische Fakultät Gießen

Referent: Professor Dr. Bernhard

Erscheint gleichzeitig unter dem Titel „Über die klinische Brauchbarkeit verschiedener Verfahren zur Ermittlung des Lipasegehaltes im Blutserum“ im Verlag Robert Noske, Borna Bezirk Leipzig

Die Bestimmung der Lipase im Blutserum hat in jüngster Zeit sehr an Bedeutung gewonnen. Denn zu den verschiedensten Untersuchungen, die teils diagnostische, teils rein wissenschaftliche Erkenntnisse ermöglichen, dienen Veränderungen der Menge und der Vergiftbarkeit dieses Enzyms. Vor allem eröffnete Professor Bernhard, Gießen, neben seinen Untersuchungen über Pankreaslipase durch die Krebsdiagnose aus der Lipase des Blutserums noch gar nicht zu übersehende Aussichten und gab damit unmittelbaren Anlaß zu vorliegender Arbeit.

A. Klinisch wichtige Veränderungen der Serumlipase.

Auf den ersten Blick erscheint es erstaunlich, daß sich ein fettspaltendes Ferment, die Lipase, im Blut befinden soll. Doch ist schon allein durch theoretische Überlegung festzustellen, daß im Organismus auch außerhalb des Intestinaltraktes ein Abbau von Neutralfett in großen Mengen stattfinden muß (Saxl). Denn durch den ductus thoracicus ergießt sich bei fettreicher Nahrung ein Strom von Neutralfett in das Blut, das nach einiger Zeit wieder daraus verschwindet; bei der Fettwanderung (Rosenfeld) kommt es zur Mobilisierung desselben im Bereiche der großen Fettlager; bei der Abmagerung schwindet das Fett aus den Depots und den Geweben. So wurde denn auch schon um die Jahrhundertwende experimentell von vielen Autoren unter ganz verschiedenen Bedingungen im Blutserum und den meisten menschlichen Organen Lipase im wechselnder Menge nachgewiesen (Kastle, Loevenhart, Lüdy, R. Magnus, P. Th. Müller, Frau Sieber).

Am bekanntesten sind die Lipaseuntersuchungen im Blutserum bei Pankreas- und Lebererkrankungen *). Beim Verschluß der Gallen- und Pankreasausführungsgänge und der damit verbundenen Störung der Fettverdauung kommt (nach Guszich) das Pankreas durch Abflußbehinderung unter höheren Druck und gibt seine Fermente durch die Vena pancreatico-duodenalis in größerer Menge ins Blut ab. Von diesen über-

*) Aus der großen Zahl der Forscher nenne ich: Abderhalden, Barth, Bauer, Bernhard, Diena, Dreyfuß, Ehrmann, Gerö, Graßberger, Heß, Jedlicka, Jenker, Jorns, Kreisinger, Kunos, Kwilecki, Lasch, Osata, Pavlovic, Popper, Roseno, Rona, Schmitt Segenschmidt, Simon, Steudel, Wildgans u. a.

getretenen Fermenten erwies sich neben der Diastase vor allem die Lipase wertvoll für die Untersuchung. Über diese etwas grob mechanische Vorstellung hinaus ergab sich bald, daß bei jeder (akuten) Pankreaserkrankung das Blutserum eine erhöhte lipolytische Fähigkeit besitzt und daß diese „erhöhte" Lipase sich von der normalerweise im Blut vorhandenen Lipase unterscheidet. Ja, es stellte sich heraus, daß ganz allgemein bei der Erkrankung oder Schädigung irgendeines Organs eine für dieses Organ spezifische Lipase in das Blut abgegeben wird. Die Unterscheidung dieser einzelnen Organlipasen ist durch ihre verschiedene Empfindlichkeit bestimmten Giften gegenüber möglich (Rona und Mitarbeiter).

Die normale Blutlipase ist sowohl durch Atoxyl wie Chinin vergiftbar. Sie hydrolysiert besonders stark niedere Ester, doch auch Tributyrin und in ganz geringem Maße Olivenöl (Rona, Michaelis, Persiel). Diese Blutlipase stammt wahrscheinlich aus den Blutkörperchen. Aber auch aus sämtlichen anderen Organen ist vielleicht ein gewisser Anteil von Lipase im Blutserum gemischt (Oppenheimer). So wird auch die geringe Spaltung von Olivenöl dem Anteil an übergetretenen Pankreasferment zugeschrieben.

Die bei (akuten) Lebererkrankungen im Blutserum nachweisbare Leberlipase wird durch Atoxyl inaktiviert, während sie gegen Chinin resistent ist. Auch hydrolysiert sie niedrige Ester (wie Triazetin, Äthylbutyrat) sehr gut, dem entgegen Neutralfette (wie Olivenöl) kaum angegriffen werden (Loevenhart). Neben akuten Lebererkrankungen ist auch bei anderen Affektionen der Leber chininresistente Lipase im Serum nachweisbar; so bei Vergiftung mit Alkohol (Di Macco), Phosphor (Avellone), Chloroform (Pazzi Demurtas); ferner gelegentlicch bei Psychosen, regelmäßig bei manisch-depressivem Irresein, wo die Leber stets eine Rolle zu spielen scheint (Büchler). Da jedoch auch bei Nieren- und Lungenkrankheitenn chininresistente Lipase auftritt, wird der diagnostische Wert der chininresistenten Lipase bestritten (Simon).

Bei Pankreaserkrankungen ist eine atoxylresistente Lipase im Serum festzustellen. Sie wirkt betont auf Olivenöl, während sie niedere Ester nur gering spaltet. Tributyrinspaltung steht auf der Mitte, und es wird von Pankreas- und Leberlipase etwa gleich stark hydrolysiert.

Nebennierenlipase im Blut ist dadurch nachzuweisen, daß sie im Gegensatz zu Serumlipase chininfest, im Gegensatz zu anderen Organlipasen gegen Chloralhydrat empfindlich ist (Tscheboksaro). So kann sie der Erkennung hypernephroider Tumoren dienen (Jorns).

Schilddrüsenlipase (im Blut bei Basedow) ist weder durch Atoxyl noch durch Arsen zu vergiften. Sie ist vermindert nach Thyreoidektomie, vermehrt nach Thyroxingaben (Fiessinger, Introzzi u. a.). Die Gesamtserumlipase sinkt nach Injektion von (0,5 mg) Thyroxin plötzlich ab (Bach, Bauer, Acqua u. a.). Bei fortgesetz-

ten Injektionen nimmt die Lipase immer weiter ab, bis prämortal ein Anstieg erfolgt; aber dieser ist einer atoxylfesten Lipase zuzuschreiben, die (nach Fiessinger) aus der Schilddrüse selbst stammt. Antithyreoidin (aus Blut gewonnen) und Verfütterung von Blutlipoiden verhindern das Absinken.

Beobachtungen, die sich nicht mit der Organspezifität auseinandersetzten, sondern nur die unvergiftete Gesamtblutlipase berücksichtigten, ergaben folgendes:

Abnahme der Gesamt-Lipase im Blut bei kachektischen Individuen und atrophischen Säuglingen (Sammelson und Beunier), erschöpfender Arbeit (Sereni), bei Typhus abdominalis (Abnahme proportional der Schwere des Falles) (Diastase stets gesteigert), bei Fleckfieber (Diastase normal), mit zunehmendem Alter — aber ohne Zusammenhang mit dem Grad der Alterserscheinungen (Nitzulescu), bei Lues, Atheriosklerose (Dörle), in der Schwangerschaft (Edelmann) und bei Tuberkulose (Kanocz). Je maligner die Tuberkuloseform, desto stärker soll die Abnahme der Lipase sein (Kollert, Frisch). Darüber hinaus sind solche Individuen, in deren Blut die Lipase in großem Maße vermindert ist, nicht fähig, in ihren Depots Fett abzulagern (Rona).

Zunahme der Gesamt-Lipase im Blut findet man nach Bestrahlung (Pincussen, Bernhard), nach Insulininjektionen (Remesow) und häufig bei dem erwähnten Übertritt von Organlipasen. Während es sich aber bei den beiden erstgenannten um eine Vermehrung der echten — durch Atoxyl und Chinin vergiftbaren — Blutlipase handelt, addiert sich bei letzterem die übergetretene Organlipase zu der normalen Blutlipase.

Nach Wirttanen und Artuzzi unterscheiden sich zwar nicht die verschiedenen Organlipasen, sondern ihre Wirkungsweise wird von gewissen Stoffen der Organe verschieden beeinflußt. So wird auch die vermehrte chininfeste Lipase bei Leberschädigungen durch Übertritt von mehr als normalen Mengen gallensaurer Salze erklärt; denn an sich erhöhen die Cholate die Chininresistenz der Serumlipase (Avellone, di Macco). Ebenso soll die Verminderung der Serumlipase bei Schwangerschaft darauf beruhen, daß sie durch Adsorption an das im Blut vermehrte Cholesterin unwirksam wird; und umgekehrt sollen Insulininjektionen die Blutlipase dadurch erhöhen, daß sie das Cholesterin im Blut vermindern, während Calzium-Oleat, Phosphate usw. durch Zerlegung des Adsorbates die Lipase „aktivieren" sollen (Remesow, Edelman).

Was nun auch der Grund für die Erhöhung der lipolytischen Fähigkeit des Serums und für das Auftreten einer organspezifischen Giftresistenz sein mag, man kann aus der Art der Lipasewirkung auf die Erkrankung eines bestimmten Organs durch Untersuchung des Blutserums schließen. Solche diagnostischen Lipasebestimmungen bieten z. B. bei Pankreaserkrankungen eine wertvolle Ergänzung der Diastaseuntersuchungen nach Wohlgemuth, denen sie in vielen Beziehungen überlegen sind (Bernhard).

Neben den oben erwähnten diagnostischen Möglichkeiten der Lipaseuntersuchungen im Blutserum kann die Lipase des Serums ferner der Krebsdiagnose dienen.

Nach Bernhard ist bei Anwesenheit eines Carcinoms in den meisten Fällen sowohl die unvergiftete wie die durch Atoxyl vergiftete Lipase des Blutserums vermehrt — bzw. in anderen Fällen ebenso deutlich vermindert (siehe auch Kronin Lowe, Watermann, Freund, Rosenheim, Shaw, Mackenzie, Lewis). Es ist also die Carzinomallipase ebenso wie die Pankreaslipase weitgehend resistent gegen Atoxyl. Sowohl die Gesamtlipase wie die atoxylresistente Lipase sind beim Auftreten eines Carzinoms vermehrt, bzw. die lipolytische Fähigkeit des Serums ist höher. (Nach Kronin Lowe bedeutet das eine natürliche Abwehrkraft des Körpers.) Beim fortgeschrittenen Carzinom ist dagegen die Lipaseaktivität gegenüber der Norm herabgesetzt und durchläuft beim Übergang der Vermehrung in die Verminderung normale Werte. Dabei ist — und das ist diagnostisch wichtig — die Verminderung der Gesamt-Lipase stärker als die der atoxylresistenten Lipase. Entsprechend kehren nach Radikaloperation des Tumors vorher erniedrigte bzw. erhöhte Werte zur Norm zurück und erhöhen sich bei einem beginnenden Rezidiv. Im weiteren Fortschreiten des Tumors ist dann wieder das Verhältnis der enzymatischen Aktivität zwischen atoxylunempfindlicher Lipase und unvergifteter Gesamt-Lipase wichtig, da die Gesamt-Lipase früher absinkt als die atr. Lipase. So sind auch präkanzeröse Prozesse wie Prostatahypertrophie, Mastitis chronica cystica, Adenom und Fibroadenom der Mamma in ihrer Entwicklungsstufe zum Carzinom hin an Hand der Blutlipase zu verfolgen. Ebenso zeigt sich die Wirkung der Röntgenstrahlen auf ein Carzinom an der Lipase des Serums, indem bei erfolgreicher Bestrahlung die Lipasewerte zunächst ansteigen, um bei völliger Zerstörung des Tumors zur Norm abzusinken. All diese Lipasebestimmungen Bernhards — von Köhler in großen Versuchsreihen bestätigt und erweitert — dienen also nicht nur der Diagnose eines malignen Tumors an sich, sondern auch die immunbiologische Lage, die Abwehrkraft des Körpers und das Stadium des Tumors, ja selbst Wirkung der Therapie und eventuelle Rezidivgefahr spiegeln sich in ihnen.

Weiter galt es bei meiner Arbeit zu prüfen, welche Methode geeignet sein könnte, die von Bernhard angegebene Unterscheidungsmöglichkeit zwischen atoxylresistenter Krebslipase und atr. Pankreaslipase festzustellen. Es soll nämlich häufig die Carzinomlipase in den ersten beiden halben Stunden schwächere Spaltfähigkeit als in der dritten halben Stunde haben, während sich Pankreaslipase meist umgekehrt verhält.

Schließlich ist zu beachten, daß ein Unterschied in der lipolytischen Fähigkeit des Blutserums je nach dem Organ besteht, das von Carzinom befallen ist. Prägt sich doch schon in den Organextrakten (aus Operations- und Tierpräparaten) ein deutlicher Unterschied ihrer lipolytischen Fähigkeit aus. Ich habe in der Tabelle (1) in kurzer Übersicht Untersuchungs-

ergebnisse über Organextrakte und Carzinomauszüge verschiedener Organe von Köhler, Rona, Pavlovik, Simon, Broekmeier, Haas, Takata zusammengestellt.

Tabelle 1.

Lipase aus Gewebsextrakten.

		Lipolytische Fähigkeit in Gegenwart von				
		Atoxyl	Chinin	Serum	Atoxyl Serum	Chinin Serum
Niere	niedrig	−	+	+	(−)	+
Pankreas	hoch	+	(−)	(−)	+	
Leber		−	+	+	+	+
Magen	mäßig hoch	+	+			
Milz	fast ∅					
Schilddrüse		(+)		+	(−)	
Ca. des Rektum	sehr niedrig	+	+			
„ der Mamma	„ „	+	+			
„ der Prostata	„ „	+	(+)	+	+	+
„ des Magens	hoch	(+)	(+)			

Es bedeutet: + lipolytische Fähigkeit unvergiftbar
(+) „ „ nur leicht vergiftbar
(−) „ „ weitgehend „
− „ „ völlig „

Das Ergebnis weicht (wie Tabelle 1 zeigt) je nachdem, ob den Organextrakten Serum zugegeben wurde oder nicht, stark voneinander ab. Für diagnostische Zwecke aus dem Blutserum ist natürlich nur die lipolytische Aktivität der Extrakte in Gegenwart von Serum annähernd den Lipasebestimmungen aus dem Blut vergleichbar. Wie sehr diese Werte auseinandergehen, sieht man an folgenden Feststellungen Köhlers: Im Blutserum bei Magencarzinom findet man kaum atoxylresistente Lipase, obwohl Magenwand- und Magencarzinomextrakte hohe atr. Lipase enthalten. Bei Mammacarzinom hat das atoxylvergiftete Serum besonders starke Spaltfähigkeit für Fette, während normales Mammagewebe so gut wie keine atr. Lipase enthält. Näheres über Serumlipase bei Carzinomen verschiedenen Sitzes und die diagnostischen Grenzen der Serumlipase bei Carzinom ist bei Bernhard und Köhler nachzulesen.

B. Verfahren zur Ermittlung der Lipase im Blutserum.

Dieser kurze Einblick in den klinischen Verwendungsbereich der Serumlipase mag die Bedeutung der Blutlipase aufdecken. Im Hinblick auf diese Untersuchungen habe ich verschiedene Verfahren zur Ermittlung des Lipasegehaltes im Blutserum auf ihre klinische Brauchbarkeit geprüft.

Die Lipase selbst ist nicht einmal in ihrer Struktur bekannt, viel weniger einem Nachweis zugänglich. Wir müssen uns deshalb beschränken, sie an ihrer Wirkung zu erkennen.

Grundsätzlich könnte zum Nachweis des lipolytischen Spaltungsvermögens jede Eigenschaft dienen, die den zu spaltenden Körper von seinen Spaltprodukten unterscheidet. Vorausgesetzt ist natürlich, daß das Verschwinden des gespaltenen Körpers bzw. das Auftreten seiner Spaltprodukte im Verlaufe des fermentativen Prozesses eindeutig auf die Lipase bezogen werden kann.

Bei der Spaltung von Fetten und auch der den Fetten homologen Glyzerinester niederer Fettsäuren (wie z. B. Tributyrin) werden unter Aufnahme von Wasser als Spaltprodukte Glyzerin und Fettsäuren frei. Diese sog. Verseifung ist aber nicht nur durch Einwirkung von Lipase (bzw. Esterase für niedere Fettsäure) möglich, sondern auch bei Erwärmung mit Laugen oder Säuren und durch überhitzten Wasserdampf werden Fette in ihre Komponenten zerlegt. Zum Nachweis der Lipase eignen sich also grundsätzlich die Methoden nicht, die sich auf eins dieser drei als Hilfsmittel stützen.

Am nächsten liegt es, die bei der Fettspaltung frei werdende Säure nachzuweisen. Auch dem sind beim Arbeiten mit Blutserum sofort Grenzen gesetzt; denn die geringen Mengen Fettsäure werden ohne weiteres von den Blutpuffern abgepuffert. Es entsteht also keine andere pH-Reaktion, die zum Nachweis dienen könnte, sondern es wird nur eine gewisse Menge Puffer „verbraucht". Doch kann man durch Titration den Pufferverbrauch und damit die Menge der bei der Fettspaltung freigewordenen Fettsäure bestimmen; denn selbstverständlich wird bei der Titration eine geringere Menge Säure zur Erreichung eines bestimmten Säuregrades notwendig sein, wenn bereits durch andere Säuren — in diesem Falle also Fettsäure — ein gewisser Pufferverbrauch vorweggenommen ist. — Auch eine zweite Methode, die sich auf die bei der Fettspaltung freiwerdende Fettsäure stützt, ist brauchbar: die gasanalytische. Hierbei dient die Säure dazu, Kohlendioxyd aus einer zugegebenen Bikarbonatlösung auszutreiben. Das Volumen der ausgetriebenen Kohlensäure wird im Manometer bestimmt und ist ein Maß für die freigewordene Fettsäure. Auf den ersten Blick scheint auch diese Methode für eine gepufferte Lösung, wie das Blutserum, ungeeignet, da ja doch die bei der Fettspaltung gebildete Säure sofort abgepuffert wird.

Doch beruht ja gerade der Vorgang der Säurepufferung im Blut darauf, daß das Natrium des Natriumbikarbonates im Blutplasma zur Bindung der Säure benutzt wird, während das dabei entstehende Kohlendioxyd durch die Lunge abgeatmet wird. Ebenso entsteht also auch hier in vitro schon ohne pH-Änderung Kohlendioxyd, das manometrisch gemessen werden kann.

Neben der Bildung von Säure wird bei der Fettspaltung die Oberflächenspannung geändert. Es sind nämlich die Glyzerinester in wässeriger Lösung stark oberflächenaktiv, und zwar im Sinne der Herabsetzung der Oberflächenspannung reinen Wassers. Im Gegensatz dazu sind die Spaltprodukte, die unter Einwirkung der Lipase entstehen, nur wenig oberflächenaktiv. Es nähert sich also im Verlauf der Spaltung der niedere Wert der Oberflächenspannung einer Fettlösung dem höheren des Wassers. Diese Änderung der Oberflächenspannung ist zum Nachweis der Lipasewirkung zu verwenden; doch sind nicht alle Methoden zur Messung der Oberflächenspannung für Lipaseuntersuchungen verwertbar. Vor allem die einfachste — die Steighöhenmethode —, die auf der Kapillarität oder Adsorption, also auf der Oberflächenspannung zwischen festen Körpern und Flüssigkeiten beruht, ist deshalb unbrauchbar, weil fetthaltige Flüssigkeiten die Benetzbarkeit der Kapillare ändern und somit falsche Ergebnisse liefern. Es bleiben als verwendbare Methoden mit dem Prinzip der Oberflächenspannungsmessung:

Die Tropfmethode oder Stalagmometrie. Aus einer Pipette (Stalagmometer) fließt ein bestimmtes Volumen einer Flüssigkeit in desto größeren — und damit desto weniger — Tropfen aus, je größer die Oberflächenspannung ist; denn die Oberflächenspannung wirkt in diesem Falle der Schwere entgegen und hält den Tropfen solange an der Auslaufpipette fest, bis infolge der nachfließenden Flüssigkeit die Schwere des Tropfens gleich der Oberflächenspannung ist. Unter gleichen Bedingungen (d. h. Temperatur, spez. Gewicht der Flüssigkeit, Verunreinigung der umgebenden Luft mit Staub und flüchtigen Reagentien, Barometerstand müssen gleich sein) ist also die Abnahme der Tropfenzahl ein Maß für die Zunahme der Oberflächenspannung.

Die Blasendruckmethode mit dem Kapillarmanometer nach Czapek. In einem Kapillarrohr, das in die zu untersuchende Flüssigkeit eintaucht, wird der Druck solange erhöht, bis die aufsteigende Flüssigkeit zurückgedrängt ist und eine Luftblase sich an dem unteren Ende der Kapillare löst. Der dazu notwendige Druck dient als Maß der Oberflächenspannung.

Die Abreißmethode. a) Bei der klassischen Methode wird die Kraft bestimmt, die ein Flüssigkeitshäutchen zerreißt, das zwischen einem Quadrat von Drähten ausgespannt ist. Die Kraft setzt an dem Drahte an, der gegen die übrigen drei fest miteinander verbundenen Drähte beweglich ist. b) Nach Searle wird die Kraft bestimmt, die zum Zerreißen eines Oberflächenhäutchens notwendig ist, das an einem Objektträger oder Ringe

adhäriert, der aus der zu untersuchenden Flüssigkeit herausgezogen wird. (Verbessert von Lecomte du Nouy, Brinkman und van Dam.)

Schließlich sei der Vollständigkeit halber noch die klassische Methode erwähnt, die die Oberflächenspannung einer „Seifenblase" bestimmt, indem der Binnendruck mittels eines Manometers gemessen wird, das an das „Seifenblasrohr" angesetzt wird.

Die Oberflächenspannung als Maß der Serumlipase.

Als Substrat, das durch die festzustellende Lipase gespalten wird, werden folgende Substanzen verwendet: Olivenöl für Glyzerinester höherer Fettsäuren, Triazetin für niedere Fette, Mono- oder Tributyrin in der Mitte stehend. Ich habe ausschließlich Tributyrin verwandt, das Pankreas- und Magenlipase in gleicher Weise gerecht wird (siehe S. 2). Es ist zwar schlechter löslich in Wasser als Monobutyrin, doch schon die geringe Menge lösbaren Tributyrins setzt die Oberflächenspannung stark herab, und es steht der echten Lipasespaltung näher als Monobutyrin. — Es ist selbstverständlich, daß das Substrat völlig gelöst sein muß; ungelöste, an der Oberfläche schwimmende Partikelchen beeinflussen die Oberflächenspannung.

Bei völliger Spaltung des Substrates wird der Wasserwert erreicht. Das Ziel der Messung ist, eine solche Menge Lipase (d. h. Serum), Butyrin und Verdünnungsflüssigkeit zu wählen, daß im Verlaufe von 90 Minuten die Spaltung nicht völlig erfolgt; so spiegelt sich nämlich der Grad der Spaltung in einem bestimmten Oberflächenspannungswert wieder, sodaß die Oberflächenspannung als Maß der lipolytischen Fähigkeit des Serums dienen kann.

Allerdings müssen folgende Bedingungen erfüllt sein, wenn die Änderung der Oberflächenspannung auf die im Serum enthaltende Lipase eindeutig bezogen werden soll (R o n a , M i c h a e l i s):

1. Butyrin darf durch Wasser nicht zu spalten sein. Also bei gleicher Temperatur und gleicher Lösungskonzentration des Butyrins in Wasser muß auch nach Tagen ein bestimmter Apparat stets den gleichen Wert ergeben. Bei Untersuchung verschiedener Lösungskonzentrationen muß man stets die normale „Oberflächenspannungskonzentrationskurve" erhalten: bei niedrigerer Konzentration des Tributyrins relativ stärkerer Herabsetzung der Oberflächenspannung.

2. Eiweißkörper oder sonstige Serumbestandteile dürfen keine Spaltung bewirken. — Der Nachweis ist an aufgekochten oder mit Fluornatrium vergiftetem Serum zu führen.

3. Die Alkalität des Blutes darf keine hydrolytische Wirkung auf den Glyzerinester ausüben. — Zur Nachprüfung wird eine Esterlösung mit einem Phosphatgemisch (zu ca. 1/30 n) von einer H-Ionen-Konzentration versetzt, die der des Blutes entspricht ($0{,}35 \cdot 10^{-7}$).

Daß alle diese Faktoren keinen Einfluß auf die Fettspaltung und Oberflächenspannung haben, ist mit der stalagmometrischen Methode von

Traube, Rona, Michaelis nachgewiesen worden. Es ist also die Änderung der Oberflächenspannung de facto auf die fermentative Wirkung des Serums zurückzuführen.

Die bei der Lipolyse frei werdende Fettsäure (und in geringerem Maße auch andere Spaltprodukte) hemmt die weitere Spaltung (Hanriot). Auch erniedrigt freie Säure die Oberflächenspannung, soweit sie nicht als fettsaures Salz von den Kationen des Blutes in Beschlag genommen wird (Rona, Michaelis). Es besteht also die Gefahr, daß das Fortschreiten des Prozesses durch Messung der Oberflächenspannung nicht zu erkennen ist. Deshalb wird der Versuchslösung ein Phosphatgemisch als Reaktionsregulator zugegeben, sodaß das Auftreten von freier Säure vermieden wird. Wir verwenden ein Puffergemisch von $p_H = 7{,}78$. (Nach Knaffl-Lenz tritt allerdings trotz Pufferung bei Tributyrin eine solche „Fermentzerstörung" durch die Säure auf, während die weitere Spaltung des Äthylbutyrats nicht gehemmt wird.)

Ein weiterer Stillstand des Spaltungsvermögens wäre durch ein echtes Gleichgewicht zwischen dem Ester und seinen Spaltprodukten denkbar; es müßte dann also auch im umgekehrten Ablauf aus Glyzerin und Fettsäuren unter dem Einfluß von Lipase Fett synthetisiert werden, was in der Tat in neuerer Zeit gelungen sein soll (siehe Oppenheimer). Es ergibt sich daraus also erst recht die Forderung, sich auf einen Spaltungsbereich zu beschränken, der nicht zu nahe an den Wasserwert herankommt (siehe S. 8).

1. Die stalagmometrische Methode.

Bei unseren hoch in die Tausende gehenden Versuchen mit der stalagmometrischen Methode hat sich folgende Versuchsanordnung als die günstigste herausgestellt:

Wir benutzen ein 16 cm langes Stalagmometer (siehe Fig. 1), dessen Wasserwert bei 20^0 Temperatur 94 Tropfen beträgt. Gesättigte Tributyrinlösung hat 145 Tropfen. Diese Stalagmometer ist an einem Stativ befestigt, an dem ferner ein Thermometer hängt, um größere Temperaturunterschiede berücksichtigen zu können.

Zur Vorbereitung des Versuches muß

a) die gesättigte Tributyrinlösung stets frisch hergestellt werden; sie darf höchstens einen Tag alt sein. Wir schütteln im Schüttelapparat 600 ccm destilliertes Wasser 3 Stunden lang mit 6 Tropfen Tributyrin. Vor dem Versuch filtrieren wir die Lösung, um jedes eventuell nicht gelöste Tributyrintröpfchen zu entfernen (siehe S. 8). Wir verwerfen deshalb auch den ersten und den letzten Filterdurchgang und achten darauf, daß das Filter stets bis zum oberen Rande gefüllt ist.

b) Der Puffer, der zur Kompensierung der bei der Tributyrinspaltung frei werdenden niederen Fettsäure dient, muß kurz vor dem Versuch neu zubereitet werden. Wir benutzen einen Puffer von $p_H = 7{,}78$ und

stellen ihn durch Mischung eines Teiles 1/3 molarer primärer mit 14 Teilen 1/3 molarer sekundärer (käuflicher) Natriumphosphatlösung her. Nach unserer Erfahrung empfiehlt es sich, diese Lösungen stets von der gleichen Firma zu beziehen oder aber den pH-Wert regelmäßig zu bestimmen.

c) Das Stalagmometer muß kurz vor dem Versuch mittels Durchsaugen von Wasser gesäubert werden.

Das auf seinen Lipasegehalt zu untersuchende Serum muß sorgfältig entnommen und zentrifugiert werden, sodaß es völlig klar ist. Zu einer Untersuchung auf atr. Lipase mit der zugehörigen Kontrolle benötigt man 3 ccm Serum, also reichlich 6 ccm Blut; doch kann man auch mit der Hälfte auskommen. Es soll nicht älter als höchstens zwei Tage sein und im Eisschrank aufbewahrt werden.

Für das Serum je eines Patienten nehmen wir 2 kleine Erlenmeyerkölbchen, die wir mit K (d. h. Kontrollversuch = Bestimmung der Gesamtlipase) und A (d. h. atoxylvergiftete Lipase) und dem Namen des Patienten versehen. In A werden 2 ccm Serum und 1 ccm 0,2% Atoxyl sorgfältig abpipettiert (selbstverständlich für jedes eine frische, peinlich gesäuberte und im Wärmschrank getrocknete Pipette), in K 1 ccm Serum. Da man (nach Untersuchungen von R o n a und B a c h) weiß, daß das Atoxyl seine Giftwirkung auf die Lipase erst nach 15 Minuten völlig entfalten kann, wartet man 20 bis 30 Minuten und gibt dann je 2 ccm Puffer hinzu. Ehe wir nun das Tributyrin hinzufügen, lassen wir die gesättigte Tributyrinlösung das Stalagmometer passieren. Das hat einmal den Vorteil, daß das Spülwasser restlos entfernt und die Abtropffläche richtig vorbereitet wird, ferner aber wird kontrolliert, ob das Stalagmometer wirklich sauber, bzw. die Tributyrinlösung einwandfrei ist; denn eine einwandfreie Tributyrinlösung ergibt bei 20° Temperatur in unserer Pipette, wenn sie sauber ist, genau 145 Tropfen. Jetzt geben wir in die Erlenmeyerkölbchen je 50 ccm Tributyrin. Doch beginnen wir erst nach 3 Minuten mit der Tropfenzählung, weil vor völliger Durchmischung der beiden Lösungen ein dauernd wechselnder, unverhältnismäßig niedriger Oberflächenspannungswert (d. h. hoher Tropfenzahlwert) sich ergibt. Zählt man nach 3 Minuten, so hat man wieder die Möglichkeit, sich zu kontrollieren, ob man richtig gearbeitet hat. Denn es liegt (bei unserer Pipette, bei 20°) der K-Wert genau 2 Tropfen höher als der A-Wert, und zwar meist bei 130 bzw. 128 Tropfen.

Im Gegensatz zu anderen Untersuchern, die die Lösung bis zu der Marke aufziehen, schütten wir die Lösung von oben in die Tropfpipette. Das ist einmal viel einfacher, hat ferner aber auch gleichzeitig den Vorteil, daß das Stalagmometer völlig von allen Resten der zuvor untersuchten Lösung befreit wird; denn wenn man die Pipette bis oben hin voll gießt, fließt die Lösung zunächst im Strahl aus, und erst wenn der trichterförmige obere Teil leer ist, beginnt das regelmäßige Abtropfen. Man wartet dann, bis das Flüssigkeitsniveau die obere Marke erreicht hat und zählt die Tropfen, bis die untere Marke passiert wird.

Die lipolytische Spaltfähigkeit des Serums (oder einer sonstigen Lösung) verfolgen wir durch Tropfenzählung nach 30, 60 und 90 Minuten und beziehen diese Werte auf den nach 3 Minuten festgestellten Anfangswert. Der 30- und 60-Minuten-Wert dienen dazu, das Fortschreiten des Spaltungsprozesses zu beobachten und eventuell die „Carzinomkurve" nach Bernhard festzustellen. Die Differenz aus 3-Minuten-Wert und 90-Minuten-Wert nehmen wir als Maß der Lipaseaktivität (der „Lipasemenge") — und zwar sowohl der Gesamtlipase wie auch der gegen Atoxyl (oder ein anderes Gift) resistenten Lipase.

In unserer Pipette zeigt das unvergiftete Serum (die Gesamtlipase) eine Abnahme der Tropfenzahl um 19 bis 24 Tropfen. Wir haben eine geringere Tropfenabnnahme als andere Autoren, da wir für den K-Versuch nur 1 ccm Serum (an Stelle 2 ccm) verwenden. Das hat seinen guten Grund, da wir so vermeiden, daß das Tributyrin völlig aufgespalten wird, oder daß man sich auch nur dem „Wasserwert" allzu sehr nähert; denn bei niedrigerer Konzentration der Tributyrinlösung geht die Spaltung nicht mehr linear weiter, sondern nähert sich in Form einer Hyperbel dem „Wasserwert" — wie man aus Eichkurven, bei denen die Abhängigkeit der Tropfenzahl zu Prozent der Tributyrinsättigung der Lösung in einem Koordinatensystem eingetragen wird *), sehr gut ersieht. Diese Schwankungen oder das fast völlige Aufspalten zum Wasserwert des Stalagmometers (siehe auch S. 8—9) vermeiden wir also dadurch, daß wir nur 1 ccm Serum für den K-Versuch verwenden. So ist es möglich, eine Zu- und Abnahme der Gesamtlipase festzustellen. Und das ist (nach Bernhard und Köhler) sehr wichtig, da ein Carzinom z. B. sicher zu diagnostizieren ist, wenn die Gesamtlipase vermindert und die atr. Lipase vermehrt ist; denn im Gegensatz dazu ist bei Pankreaserkrankungen beides vermehrt.

Chininvergiftetes Serum eines Normalen ergibt eine Tropfendifferenz von 2 bis 4. Von 6 Tropfen an ist mit Sicherheit eine pathologische Vermehrung anzunehmen. Ich bin im folgenden nur auf atoxylresistente Lipase eingegangen, die methodisch alles zeigt, was auch für jedes andere vergiftete Serum gilt.

Bei atoxylvergiftetem Serum ist in unserem Stalagmometer eine Differenz von 4 Tropfen für das Serum eines Gesunden die Regel. Bis 5 Tropfen sind auch noch zum Normalen zu rechnen. 6 Tropfen sind schon meist pathologisch, während 7 Tropfen und mehr einwandfrei eine krankhafte Vermehrung der atr. Lipase anzeigen. — Bei verschiedenen Autoren werden sehr auseinander gehende Tropfendifferenzen als pathologisch bzw. normal bezeichnet. So nimmt Katsch eine Tropfenzahl von 4 bereits als Erhöhung der atr. Lipase an, während Rona und Lasch den Wert 6 noch als normal ansehen. Simon hält erst eine

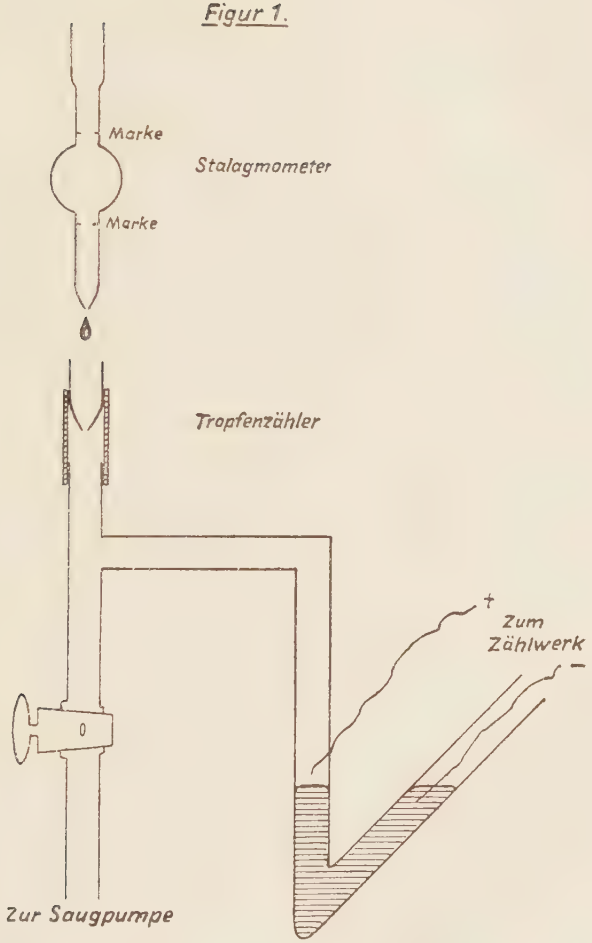
*) Ich verweise z. B. auf die Eichkurve in Rona, Praktikum der physiologischen Chemie.

Tropfendifferenz von 7 bis 8 für ausschlaggebend. Mag der Unterschied einerseits in der verschieden strengen Beurteilung liegen, so bedingen doch die verschiedensten Faktoren einen Unterschied in der Tropfenzahl: jede Pipette hat einen für sie spezifischen Wasserwert; das liegt nicht nur an der verschiedenen Größe der Pipetten oder dem verschiedenen Abstand der Marken, kurz also dem verschiedenen Fassungsvermögen, sondern auch an der Form des Auslaufrohres und damit der verschiedenen Abtropffläche. Auch bei der sorgfältigsten Herstellung wird sich die Abtropffläche nicht normen lassen, da die Benetzbarkeit je nach Schliff, verwendetem Material, je nach kleinsten Riffelungen infolge der Kohäsion bzw. kapillaren Attraktion verschieden sein wird und damit sich dann auch die Tropfengröße, also auch die Tropfenzahl verschieden verhalten wird. Ferner wird selbstverständlich die Tropfenzahl von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben, wenn sie bei anderem p_H oder mit anderen Mischungsverhältnissen der Lösungen arbeiten. Auch ergibt verschiedene Temperatur bei der gleichen Pipette verschiedene Tropfenzahl. Und zwar ändert sich bei unserem Stalagmometer die Tropfenzahl um 1, wenn sich die Temperatur um 5^0 ändert. Rona läßt die Temperatur unberücksichtigt, sofern sie innerhalb $2—3^0$ die gleiche bleibt. An anderer Stelle gibt Rona an, daß sich die Tropfenzahl um 2 erhöht, falls die Temperatur um 10^0 steigt. Michaelis teilt zwar im Gegensatz dazu mit, daß bei Temperaturänderung von $\pm 5^0$ (im Wasserbade), also einer Zu- oder Abnahme der Temperatur um 1^0 eine Zu- oder Abnahme der Tropfenzahl um 2 zur Folge hat. Er fügt dann aber hinzu, daß ein Vergleich mit dem vorausgehenden und folgenden Werte wohl gestatte, eine Änderung von 2 oder 3 Tropfen zu verwerten, da ja ein Fortschreiten der Spaltung in gleicher Richtung konstatiert werden kann.

Aus den Verschiedenheiten der Tropfpipetten untereinander ergibt sich also die Notwendigkeit, jede Pipette zu eichen. Es ist nun nicht nötig, eine Eichkurve — wie ich sie bereits (S. 11) erwähnte — aufzustellen; denn es kommt bei den klinischen Untersuchungen nicht darauf an, den Prozentgehalt der Tributyrinsättigung festzustellen, bis zu dem die zu untersuchende Lipase die gesättigte Tributyrinlösung aufgespalten hat. Sondern es genügt vielmehr eine relative quantitative Bestimmung des fettspaltenden Fermentes. Man braucht deshalb nur den Wasserwert und den Tropfwert der gesättigten Tributyrinlösung zu ermitteln und deren Abhängigkeit von der Temperatur. Untersucht man nun mehrere Normalseren vergiftet und unvergiftet nach 3, 30, 60 und 90 Minuten, so kann ihre Tropfendifferenz für alle späteren Versuche als Norm dienen. Ein Über- oder Unterschreiten dieser normalen Tropfenzahlen zeigt in der Folge also eine Vermehrung oder Verminderung der Lipase an.

Auch über die genaue Kenntnis der Normalwerte der Tropfpipette hinaus muß man völlig mit seinem Stalagmometer vertraut sein. So ändert sich ganz unauffällig allmählich die Tropfenzahl, wenn die Pipette sich verstopft. Hat man den Verdacht, so kann man sich durch Prüfung des

Figur 1.


Marke
Stalagmometer
Marke
Tropfenzähler
+
Zum
Zählwerk
−
Zur Saugpumpe

Wasser- oder Tributyrinwertes rasch davon überzeugen; hat man einige Erfahrung, so wird man schon ohne das den Grund erkennen und die Pipette sofort durch Hindurchsaugen von Wasser säubern. — Auch durch Veränderung der Abtropffläche wird die Tropfenzahl verfälscht. Der Auslauf der Pipette darf natürlich nie mit der Hand berührt werden, da die kleinsten anhaftenden Fettpartikelchen die Tropfenzahl beeinflussen; doch auch spontan wird die Abtropffläche gelegentlich verunreinigt. Man erkennt eine solche Veränderung nicht nur an der verhältnismäßig zu hohen Tropfenzahl, sondern auch an dem veränderten Ablösen der Tropfen: sie lösen sich seitlich oder schief ab oder benetzen das Auslaufrohr zu hoch. — Ferner ist der Anfangswert (3-Min.-Wert) von gewisser Bedeutung: je niedriger die Tropfenzahl ist, desto richtiger ist er. So ist bei unserer Pipette ein Wert von 128 oder 129 der beste, mehr als 132 darf er nicht sein. Ist er höher, so hat man entweder nach dem Zuschütten des Tributyrins nicht lange genug gewartet: man muß mindestens 3 Minuten, gelegentlich bis zu 6 Minuten warten, ehe sich ein „konstanter" Wert einstellt. Oder man hat bei Herstellung der Tributyrinlösung zu viel Tributyrin genommen: es sollen genau 6 Tropfen mit 600 ccm dest. Wasser geschüttelt werden.

Bei der Untersuchung mehrerer Seren ist die Zahl der zu gleicher Zeit zu untersuchenden Seren beschränkt; denn da die Tropfenzahl durchschnittlich 120 beträgt und jede Zählung ungefähr 2 Minuten dauert, sind bei guter Übung innerhalb der halben Stunde bis zur nächsten Ablesung nicht mehr als 12 Lösungen zu zählen, also 6 Seren gleichzeitig zu untersuchen. (Bei Untersuchung von Lösungen mit höherer Viskosität dauert die Tropfenzählung dieser Flüssigkeit natürlich noch länger; doch hat Traube für Flüssigkeiten von verschiedener Viskosität verschiedene Stalagmometer und Stagonometer angegeben.)

Werden 6 Sera gleichzeitig untersucht, so bleibt man 2 Stunden lang ohne Unterbrechung am Zählen der abfallenden Tropfen. Daß das nicht nur eine harte Geduldsprobe ist, sondern auch infolge der eintönigen, ermüdenden Beschäftigung leicht zu falschen Ergebnissen führt, ist nur zu natürlich. Es sind deshalb die verschiedensten Apparate zur Tropfenzählung konstruiert worden. Nach unserer Erfahrung mit mehreren Tropfzählapparaten ist der einzig zuverlässige der von Behrens*) konstruierte Tropfenzähler. Er beruht auf dem Prinzip einer schwankenden Quecksilbersäule, deren Schwankung regelmäßig durch einen von der Pipette abfallenden Tropfen zustande kommt (siehe Fig. 1). Der Tropfen passiert nämlich eine enge Düse und schließt dabei für einen Moment einen Raum ab, in den einerseits ein Schenkel der U-förmigen Quecksilbersäule mündet und an den andererseits eine Saugpumpe angeschlossen ist. Regelmäßig bei Verschluß der Düse wird die Saugwirkung auf den Quecksilberschenkel wirksam. Durch die Schwankung schließt die Quecksilbersäule

*) Dozent Dr. Behrens, Gießen, Physiologisches Institut.

nun einen Stromkreis zwischen zwei Drähten, die zu einem Zählwerk führen. Das Zählwerk ist nach dem Prinzip eines Wagnerschen Hammers gebaut und mit einem Uhrwerk kombiniert. — Dieser Apparat erleichtert die Arbeit schon ungemein, vor allem braucht man sich nicht in jedem Augenblick völlig auf das Zählen zu konzentrieren. Aber auch er ist noch nicht ideal, da er die größte Fehlerquelle, den „persönlichen Fehler", nicht auszuschalten vermag. Der Beginn und das Ende der Zählung, also der Augenblick, in dem das Flüssigkeitsniveau die Marken des Stalagmometers passiert, muß von dem Untersucher abgelesen werden und gleichzeitig der Apparat ein- bzw. ausgeschaltet werden. Und zwei gleich geübte Untersucher, die auch die Schätzung halber Tropfen beherrschen, werden stets Abweichungen voneinander zeigen, da nun mal nach den klassischen Untersuchungen H e l m h o l t z' die Reaktionszeit bei jedem Menschen anders ist. Man könnte sich einen automatischen Ein- und Ausschalter des Zählapparates denken, wenn man an den Marken des Stalagmometers je zwei Leitungsdrähte durch die Wand führte, deren Stromkreis durch die untersuchte Lösung geschlossen wird und also mit dem Moment des Durchtretens des Flüssigkeitsniveaus unterbrochen wird. Doch ist die Frage, ob bei Stromdurchtritt die Lösung nicht hydrolysiert und dadurch in ihrer Oberflächenspannung beeinflußt wird und ob die Stromunterbrechung bei der flüssigkeitsbenetzten Wand ideal möglich ist.

Zur Illustration der stalagmometrischen Methode führe ich in Tabelle 2 eine Versuchsanordnung, in Tabelle 3 und 4 einige charakteristische Untersuchungsergebnisse aus dem großen Material, das mit der stalagmometrischen Methode an unserer Klinik gewonnen wurde.

Tabelle 2.

Serum eines Gesunden.

Minuten	Tropfenzahl	
	A	K
	2 ccm Serum 1 „ Atoxyl 2 „ Puffer 50 ccm Tributyrin	1 ccm Serum — 2 „ Puffer 50 ccm Tributyrin
3	128	130
30	126	123
60	125	116
90	124	109
	4	21

In der ersten Tabelle (3) ist das verschiedene Verhalten der Lipase bei Carzinom, in Tabelle 4 bei Pankreasaffektionen aufgewiesen.

Im Frühstadium des Carzinoms, wie es Fall 1 und 2 in Tabelle 3 darstellen, sind atr. und Gesamtlipase erhöht. Zur Diagnose eines Ca. müssen

in diesem Falle also Pankreaserkrankungen, Thyreotoxikose usw. klinisch ausgeschlossen werden.

Bei Fall 3 und 4 ist die Gesamtlipase normal, die atr. Lipase ist erhöht als typisches Zeichen eines Carzinoms in dem Stadium, in dem die atr. Lipase noch erhöht ist, während die Gesamtlipase bereits wieder zum normalen Wert abgesunken ist.

Auch ist oft bereits die Gesamtlipase unter den Normalwert gesunken, während die atoxylresistente Lipase noch erhöht ist. Das ist sehr gut an Fall 5 und 6 zu sehen.

Tabelle 3.

Sera Carzinomkranker.

Nr.	Alter	Sitz des Carzinoms	Lipase in Tropfen				Bestimmung der Lipase in Tagen nach der Operation
			vor der Operation		nach der Operation		
			atr. Lipase	Gesamt-lipase	atr. Lipase	Gesamt-lipase	
1	42	Mamma	8	25	5	19	10
2	52	Rektum	11	24	4	19	11
3	48	Haut	7	20	4	20	18
4	58	Lippe	10	22	5	23	9
5	60	Magen	9	14			
6	56	Magen	7	11			
7	55	Prostata	4	21			
8	49	Mamma	5	19	4	20	9
9	52	Magen	2	7			
10	73	Ohr	3	12			
11	55	Mamma	9	28	7	18	35
12	74	Mamma	6	19	8	19	1 Jahr
13	53	Rektum	11	31	3	11	5 Monate
14	62	Ohr	9	19	5	30	32

Fall 7 und 8 demonstrieren ein Carzinomserum, das sich in dem Stadium befindet, in dem es dieselben Lipasewerte zeigt wie ein Normalserum. Es sind das die wenigen Fälle, in denen ein Carzinom durch Lipaseuntersuchung nicht diagnostiziert werden kann. Glücklicherweise dauert dieses Stadium nur kurze Zeit, und häufig ist auch die Gesamtlipase schon weiter vermindert als die atr. Lipase, so daß bei einiger Erfahrunng auch viele dieser Fälle richtig zu erkennen sind.

Fall 9 und 10 zeigen schließlich eine Verminderung beider Werte, wie es dem letzten Stadium des Carzinoms, aber auch anderen zehrenden Krankheiten und kachektischen Zuständen entspricht. Doch auch hierbei ist die Gesamtlipase meist verhältnismäßig weiter abgesunken als die atr. Lipase.

Die bisherigen Fälle blieben nach der Operation rezidivfrei. Droht ein Rezidiv, so bleibt nach der Operation der atr. Wert erhöht oder aber ein vorher niedrigerer Wert erhöht sich: Fall 11 und 12. Im Gegensatz dazu

sollen Fall 13 und 14 die große Schwankungsbreite der Lipasewerte von nach der Operation untersuchten rezidivfreien Patienten aufweisen.

Tabelle 4.

Sera Pankreaskranker.

Nr.	Name	Diagnose	Lipase in Tropfen	
			atr. Lipase	Gesamtlipase
15	K. Pf.	Akute Pankreasnekrose, Cholelithiasis	17	30
16	L. S.	Akutes Pankreasödem, Cholelithiasis	16	26
17	A. G.	Chronische Pankreatitis	10	24
18	E. D.	Cholecystitis catarrhalis	10	23
19	N. S.	Cholelithiasis	13	24

In Tabelle 4 sind verschiedene Pankreaserkrankungen aufgeführt, bei denen sowohl die atr. wie die Gesamtlipase erhöht sind. Auch bei Gallensteinleiden ist oft die Lipase erhöht, da das Pankreas mit ergriffen wird.

Kritische Übersicht

über die stalagmometrische Methode.

1. Die stalagmometrische Methode hat den Vorteil sehr geringer Kosten. Der Anschaffungspreis und die Betriebsunkosten sind sehr gering.
2. Die Empfindlichkeit ist nicht sehr groß.
3. Die Fehlergrenze beträgt etwa 1 Tropfen.
4. Die Versuchsdauer ist sehr lang: etwa 2 Stunden.
5. Das Tropfenzählen ist sehr langwierig und führt durch die Ermüdung leicht zu Fehlzählungen. Einen idealen automatischen Tropfenzähler gibt es nicht.
6. Am Beginn und am Ende der Zählung unterlaufen leicht „persönliche Fehler".
7. Verstopfung der Pipette führt unmerklich zu Tropfenabnahme.
8. Unreinigkeiten der Abtropffläche ergeben höhere Tropfwerte.
9. Temperaturerhöhung erhöht die Tropfenzahl. (Sommer, Winter!)
10. Vor der ersten Zählung ergibt zu kurzes Warten zu hohe und schwankende Werte.
11. Zu hoher Anfangswert wird auch durch „übersättigte" oder nicht lege artis filtrierte Tributyrinlösung hervorgerufen.
12. Zu altes Tributyrin wird schneller gespalten und täuscht dadurch erhöhte Lipasewerte vor.
13. Verändertes pH der Pufferlösung ergibt veränderte Werte.

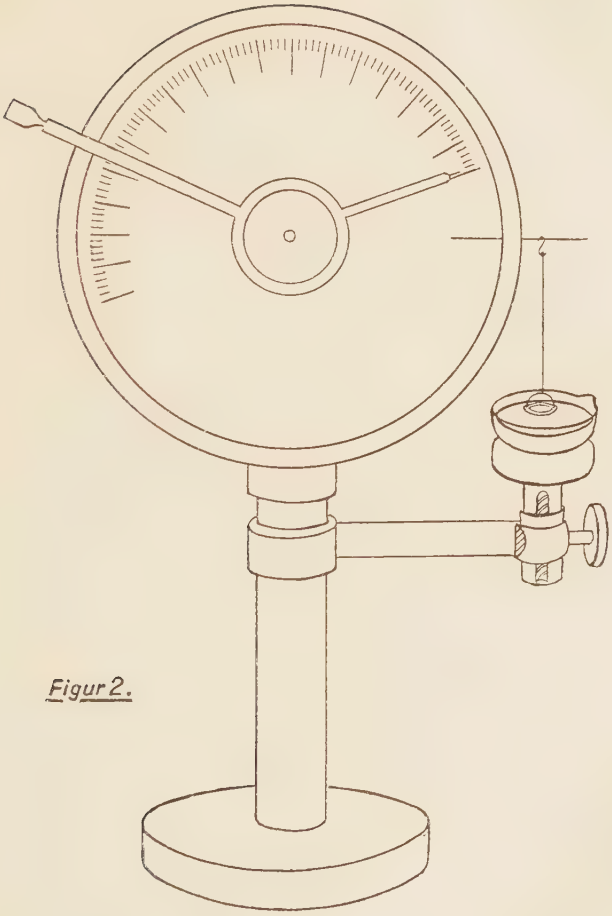
14. Zu altes oder im Hellen aufbewahrtes Atoxyl hat zu geringe Giftwirkung, so daß die atr. Lipase vermehrt erscheint.
15. Serum, das nicht völlig klar ist, gibt höhere Tropfenwerte, da auch die Erythrozyten atr. Lipase enthalten.
16. Bleibt Blut oder auch Serum (auch im Eisschrank) länger stehen, so erhöht sich die lipolytische Fähigkeit.
17. Nur eine genaue Kenntnis des Stalagmometers ergibt brauchbare Ergebnisse.
18. Die Flüssigkeitsmenge muß im Verhältnis zu dem Tropfenvolumen ziemlich groß sein, weil sonst der Versuchsfehler, der beim Messen eines Tropfenteiles immer gemacht wird, zu beträchtlich wird.
19. Verdampfung und Ausdiffundieren von Gasen können bei dieser Verteilung in Tropfen größere Fehler verursachen.
20. Verunreinigung der Luft mit Staub usw. ändert die Oberflächenspannung.
21. Werden verschiedenartige Lösungen untersucht, so muß bei ihrem Vergleich die Viskosität und das spezifische Gewicht berücksichtigt werden.

Lassen sich bei genauer Beachtung der von mir oben angegebenen Kunstgriffe Punkt 6 bis 10 und durch einige Aufmerksamkeit auch die folgenden Punkte als Fehlerquellen vermeiden, so bleiben doch folgende Mängel der stalagmometrischen Methode: für die feinen Unterschiede bei vergifteter Lipase ist die Empfindlichkeit verhältnismäßig gering, die Versuchsdauer und das Tropfenzählen sind sehr langwierig und der „persönliche" Fehler ist nicht auszuschalten.

2. Die Abreißmethode.

a) Die klassische Methode.

Die (S. 7) erwähnte klassische Methode erscheint mir klinisch schlecht verwendbar, da es schwierig ist, an das beschriebene Gittersystem eine Zugkraft anzubringen, die man stetig erhöhen kann. Vielmehr müßte man (wie es früher auch gemacht wurde) möglichst kleine Gewichte eins nach dem anderen an den erwähnten beweglichen Balken des Drähtequadrates anhängen und dadurch die Kraft erhöhen. Man wird also die Kraft stets nur ruckweise erhöhen können und evtl. eine große Zahl dieser kleinen Gewichte langwierig und zeitraubend anhängen müssen. — Wollte man aber eine Torsionswaage durch einen besonderen Mechanismus zur Messung benutzen, so wäre doch die Ausspannung der Flüssigkeitsmembran nie so exakt durchzuführen, daß sich diese Methode mit der auf ähnlichem Prinzip beruhenden modernen Abreißmethode messen könnte.



Figur 2.

b) Die Abreißmethode nach Searle, Brinkman.

Bei dieser Methode (s. S. 7) wird ein Objektträger (Searle) oder Ring (Brinkman und van Dam) oder Bügel (Lenard, Zachmann, v. Dallwitz-Wegener) senkrecht von der Oberfläche der zu untersuchenden Flüssigkeit abgehoben. Das adhärierende Flüssigkeitshäutchen muß dabei zerrissen werden. Die dazu notwendige Kraft dient als Maß der Oberflächenspannung. Wie schon oben erwähnt, kommt es bei den klinischen Untersuchungen nicht auf Feststellung des absoluten Wertes der Oberflächenspannung an, sondern der relative Wert — der Unterschied zwischen der Oberflächenspannung des ungespaltenen und gespaltenen Tributyrins — ist das Wichtige zur Ermittlung des Lipasegehaltes des Serums (oder einer anderen Flüssigkeit). Die Kraft, die wir zum Abreißen des am Ring (o. a.) adhärierenden Flüssigkeitshäutchens benötigen, muß stetig zu erhöhen sein. Dazu ist die Torsionswaage (der Fa. Hartmann und Braun, Frankfurt), die sich heute schon in fast allen Laboratorien befindet, sehr gut geeignet. Sie ist viel empfindlicher als die von Searle und du Nouy konstruierten Torsionsapparate und in ihrer Handhabung sehr einfach. Man hängt an die Torsionswaage (s. Fig. 2) ein kleines Platinringchen, bringt die Waage jetzt in Gleichgewichtstellung und arretiert sie. Dann schraubt man mit Hilfe eines dafür konstruierten Stellarms das Flüssigkeitsniveau der zu untersuchenden Lösung so hoch, daß die Unterfläche des Platinringes das Flüssigkeitsniveau eben berührt und an der Lösung adhäriert. Dieser Moment kann mit Hilfe des Stellarms sehr genau eingestellt werden. Ehe man nun wieder die Waage entarretiert, muß man die Torsionsspannung (Kraft) um 60 bis 80 mg erhöhen, da sonst der Ring in das Wasser gezogen und also nicht nur die Oberfläche benutzt wird. Danach macht man nun eine so starke Torsion, daß das sich immer mehr erhebende Flüssigkeitssäulchen gerade zerreißt. Die dazu notwendige Torsionskraft ist ein Maß für die Oberflächenspannung, wenn man von ihr das Gewicht des anhängenden Platinringes und der an ihm adhärierenden Flüssigkeit abzieht. Um sich zu kontrollieren, verläßt man sich nicht auf eine Ablesung, sondern bringt nach dem Zerreißen der Flüssigkeitssäule die Torsion wieder auf 80 bis 100 mg zurück und drückt das Aufhängestäbchen so weit nach unten zurück, daß der Platinring gerade wieder die Lösung berührt. Danach bestimmt man wieder die Zerreißungskraft und muß bis auf $^1/_2$ mg genau immer wieder den gleichen Wert erhalten. Jetzt schraubt man das Schälchen mit der Untersuchungsflüssigkeit herunter und bestimmt das Gewicht des Platinringes mit adhärierender Flüssigkeit. Dieses Gewicht muß von dem zuerst bestimmten Wert abgezogen werden, um als Maß für die Oberflächenspannung zu dienen. Es kann uns gleichgültig sein, wie groß der wirkliche Oberflächenspannungswert ist. Zu unseren Bestimmungen der Lipasewirkung genügt es, die im Laufe der lipolytischen Wirkung auftretende Oberflächenspan-

nungsänderung durch mg der Zerreißungskraft zu vergleichen. Wir brauchen also keine Korrekturen anzubringen, weil evtl. das Flüssigkeitssäulchen im Moment der Zerreißung nicht senkrecht zur Ringunterfläche steht. Es genügt vielmehr, für jeden Ring den Wasserwert bzw. den Normalserumwert festzustellen.

Die Vorbereitungen zum Versuch habe ich genau so getroffen, wie bei der stalagmometrischen Methode beschrieben. Die gleiche Menge Serum, Tributyrin, Pufferlösung und Atoxyl wurden nach gleicher sorgfältiger Vorbereitung verwandt. Und zwar füllte ich stets die gleiche Menge (2 ccm) Flüssigkeit in die Untersuchungsschälchen, da ich bei verschiedenem Niveau der Lösung in den halbkugeligen, aber auch zylindrischen Gefäßen eine erhebliche Differenz der Oberflächenspannung feststellte, die wohl auf die Wandspannung des Schälchens zurückzuführen ist. So war bei unserem Ring der Wasserwert des bis zum Rand gefüllten und ebenso des mit ganz wenig Wasser beschickten Gefäßes bei etwa 72 mg, während der Wert des bis zur Mitte gefüllten Gefäßes etwa 119 mg betrug. Nur dieser Wert ist also von der Wandspannung des Gefäßes unbeeinflußt anzusehen und nur bei Beschickung des Schälchens mit stets der gleichen Menge (etwa 2 ccm) Flüssigkeit wird ein vergleichbarer Wert garantiert.

Selbstverständlich ist, daß die Gefäße sorgfältig gesäubert (entfettet) sind und daß der Platinring vor jeder Messung ausgeglüht wird. Gefäße sowohl wie Platinring dürfen nur mit der Pinzette berührt werden.

Die Messung der Oberflächenspannung mit der Torsionswaage ist ein sehr einfaches und handliches Verfahren. Die Messung ist sehr genau und ist so schnell auszufühen, daß man in der halben Stunde zwischen zwei Ablesungen bis zu 30 Lösungen messen kann — eine Zahl, die selbst in den größten Krankenhäusern je kaum zur gleichen Zeit zur Untersuchung kommt.

Aber so gut die Methode zur Bestimmung der Oberflächenspannung einer reinen Flüssigkeit ist, bei unseren Bestimmungen der lipolytischen Fähigkeit eines Serums habe ich keine brauchbaren Werte erhalten. In Tabelle 5 führe ich einige Versuchsdaten an, die zeigen, wie im Verlauf der fermentativen Spaltung die Oberflächenspannung nicht stetig zunimmt, sondern sich ganz unregelmäßig verhält. Und zwar war es bei den meisten Versuchen, so daß die mit Atoxyl vergifteten Lösungen die Tendenz zum allmählichen Abfall ihrer Oberflächenspannung zeigten, während die unvergifteten sehr gering anstiegen (s. Versuch 1). Doch neben dieser deutlichen Tendenz zeigten sich immer wieder Einzelwerte oder ganze Versuchsreihen, die völlige aus dem Rahmen fielen (s. Versuch 2).

Was ist der Grund dafür? Mit der Abreißmethode mißt man einen statischen Wert der Oberflächenspannung, während mit dem Stalagmometer ein halb-dynamischer Wert bestimmt wird. Denn die Oberfläche ist bei der stalagmometrischen Methode dauernd in Bewegung. Jeder Tropfen bildet vor seinem Abfallen eine neue Oberfläche, und eine Anhäufung von

Tabelle 5.

Oberflächenspannung des Serums, gemessen mit der Abreißmethode.

Zeit in Min.	Unvergiftet			Mit Atoxyl vergiftet		
	Abreißwert in mg	Gewicht des Ringes und adhär. Lösung	Zerreißungswert in mg	Abreißwert in mg	Gewicht des Ringes und adhär. Lösung	Zerreißungswert in mg
			Versuch 1.			
3	236,9	149,8	**87,1**	239,2	150,0	**89,2**
30	238,4	149,9	**88,5**	239,0	149,9	**89,1**
60	240,2	149,9	**90,3**	239,0	149,9	**89,1**
90	239,0	149,9	**89,1**	237,1	150,0	**87,1**
150	236,0	149,6	**86,4**	241,0	149,9	**91,1**
			Versuch 2.			
3	237,2	149,7	**87,5**	236,5	149,9	**86,6**
30	232,6	149,6	**83,0**	236,1	149,9	**86,2**
60	229,0	149,6	**79,4**	234,8	149,8	**85,0**
90	237,7	149,9	**87,8**	230,5	149,5	**81,0**
150	237,8	149,9	**87,9**	233,2	149,7	**83,5**

oberflächenaktiven Stoffen ist in der kurzen Zeit bis zum Abfallen nur bis zu einem gewissen Grade möglich. Jedenfalls bei kolloidalen Lösungen, mit denen wir es hier zu tun haben, vollzieht sich diese Adsorption der oberflächenaktiven Substanzen in der Grenzschicht sehr langsam (im Gegensatz zu molekulardispersen Lösungen). Oder mit anderen Worten — bei biologischen, kolloidhaltigen Lösungen geht die dynamische Oberflächenspannung nur sehr langsam in die statische über. Und während wir also mit der stalagmometrischen Methode einen Wert bestimmen, der fast rein dynamisch ist — d. h. bei dem die Oberflächenschicht fast ebenso zusammengesetzt ist wie die übrige Lösung —, messen wir mit der Abreißmethode die statische Oberflächenspannung. Das drückt sich z. B. darin aus, daß die relative Oberflächenspannung einer 0,001% Natriumoleatlösung mit dem Stalagmometer gemessen gleich 1, mit der Ringmethode gemessen aber 0,73 ist. Dieser Vorteil der Abreißmethode, der es auch gegenüber der stalagmometrischen Methode gestattet, ganz geringe und sehr langsam in die Oberfläche diffundierende oberflächenaktive Stoffe zu bestimmen, birgt nun andrerseits die Gefahr in sich, daß der statische Wert noch nicht völlig erreicht ist, wenn man die Messung ausführt. Und so werden eventuell statische mit halbdynamischen Werten verglichen. Da ich darauf die Falschwerte zurückzuführen glaubte, wartete ich bei jedem Versuch eine ganz bestimmte Zeit, nachdem ich die Lösung frisch eingegossen oder (bei dem 30-, 60- und 90-Minuten-Wert) frisch umgegossen hatte. Nun ist es aber natürlich schon aus der Aufgabenstellung der Lipase-

bestimmung unmöglich, eine halbe Stunde zu warten, in welcher Zeit erst das Minimum der Oberflächenspannung eines Serums erreicht wird. Aber auch aus einem anderen Grunde darf man nicht so lange warten, wie es nötig wäre; als eiweißhaltige Flüssigkeit neigt das Serum zur Membranbildung von oberflächenaktiven Peptonen an der Oberfläche, so daß eine scheinbare starke Erhöhung der Oberflächenspannung resultiert. Und wenn man dieses Oberflächenhäutchen durch Abstreichen mit Filtrierpapier zerstört, so erzeugt man gleichzeitig wieder eine Oberfläche, die nicht mehr rein statisch ist. Man steht hier also zwischen Szylla und Charybdis; und es ist mir deshalb auch nicht gelungen, brauchbare Werte zu finden.

Die Empfindlichkeit dieser Methode erscheint nach den in Tabelle 5 angegebenen Werten sehr gering zu sein. Doch liegen bereits diese Werte weit außerhalb der Fehlergrenzen der Torsionswaage. Ferner ist aber im Verhältnis zur stalagmometrischen Methode eine viel geringere Flüssigkeitsmenge notwendig, so daß durch Verminderung der Puffer- und Tributyrinmenge eine relative Vermehrung des Serums und damit eine höhere lipolytische Fähigkeit der Lösung zu erreichen wäre. Ferner könnte man eine Spezial-Torsionswaage bauen, die ich der Firma Hartmann und Braun vorgeschlagen habe. Diese Waage müßte einen Meßbereich von 0 bis 130 mg haben, so daß man noch gut den Wasserwert (119 mg) bestimmen kann. Es würde ein Skalenteil bei dieser Waage 0,25 mg entsprechen, während obige Versuche mit Torsionswaagen gemacht wurden, bei denen 1 Skalenteil 1 mg entspricht; sie hatten teils einen Meßbereich von 0 bis 500, teils von 0 bis 300 mg. Da nun aber der Platinring ein Gewicht von etwa 145 g hat (also bei Werten von 230 bis 280 mg gemessen werden muß), müßte diese Torsionswaage mit einer Vorlast ausgestattet werden, die dem Gewicht des Platinringes entspricht. Zwar erhöht sich im Lauf der Zeit das Gewicht des Platinringes um wenige mg; doch stört das bei unseren Versuchen gar nicht, da bei der Wägung der adhärierenden Flüssigkeit ebensogut die leichte Gewichtserhöhung des Platinringes mitbestimmt wird und gleichzeitig ohne irgendeine Rechnung von der Abreißkraft mit abgezogen werden kann.

Abschließend ist also die Abreißmethode mit der Torsionswaage als methodisch ideal zu bezeichnen. Doch ist zur Lipasebestimmung im Serum (wegen der Störungen durch Membranbildung und der langsamen Einstellung des statischen Oberflächenwertes im Serum) vorläufig eine klinische Verwendbarkeit noch nicht möglich. Es wäre dieser allen anderen an Handlichkeit überlegenen Methode sehr zu wünschen, wenn die Fehlerquellen (vielleicht durch Enteiweißung des Serums o. a.) ausgeschaltet werden könnten.

3. Das Kapillarmanometer.

Das Kapillarmanometer beruht auf dem (zuerst von Simon beschriebenen) Prinzip, daß die Oberflächenspannung durch die Druckhöhe einer Flüssigkeitssäule gemessen werden kann, durch die eben eine Luftblase

durch die zu prüfende Lösung hindurchgepreßt wird. Nach Verbesserungen verschiedener Autoren entwickelte Czapek daraus sein Kapillarmanometer. Es ist ein Wassermanometer, dessen kürzerer Schenkel nochmals U-förmig nach abwärts gebogen ist und mit einem Kapillarrohre endigt.

Die Kapillarmündung muß genau halbkugelig abgeschliffen und hochpoliert sein, damit sich die Oberfläche der Luftblase allseits gleich von der Glaswand ablöst. Eine kurze (etwa 2 mm lange) Kapillare ist günstiger, da (nach Whatmough) lange Kapillaren durch die Reibung der Luftsäule in ihnen zu unrichtigen Ablesungen Anlaß geben.

Von der Weite des Kapillarrohres hängt die Größe des Druckes ab, welcher nötig ist, um eine Luftblase aus der Kapillare herauszupressen. Ich wählte einmal eine Kapillarweite von 1,5 mm bei einer Länge von 12 mm; bei einem zweiten Apparat nahm ich eine Kapillare von 1 mm Weite und 2 mm Länge (wie Czapek), um größere Genauigkeit zu erzielen.

Doch ergaben beide Manometer für die feinen Unterschiede, die zur Lipasebestimmung diagnostischer Art notwendig sind, nicht genügend genaue Werte. Denn die Einstellung des Druckunterschiedes im Manometer ist nicht sehr genau durchzuführen und damit der Fehlerbereich groß.

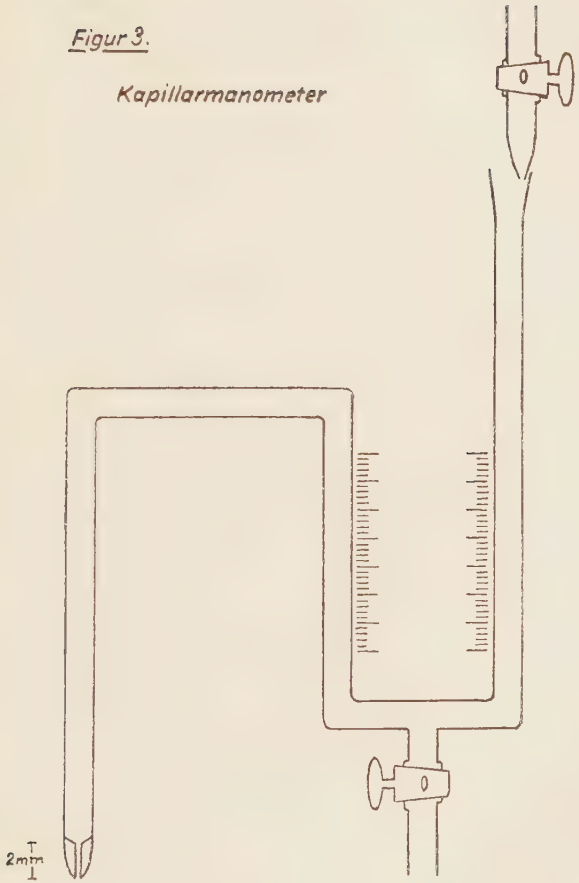
Hinzu kommt die umständliche Handhabung des Apparates: die Tiefe des Eintauchens der Kapillare muß sehr genau mit der Lupe eingestellt werden; nach jeder Ablesung muß umständlich die Kapillare gesäubert werden, indem man nach Ablassen des Manometerwassers zuerst die restliche Flüssigkeit ausbläst, dann destilliertes Wasser ansaugt und ausbläst, heißes Chromsäuregemisch längere Zeit einwirken läßt und dieses dann wieder durch mehrfaches Ansaugen und Ausblasen von destilliertem Wasser auswäscht. Zwar kann man bei der Untersuchung unserer gleichartigen Flüssigkeiten evtl. sich darauf beschränken, mit absolut reinem Wasser auszuwaschen und mit der nachfolgenden Untersuchungslösung nachzuspülen. Doch trotzdem sind in der verfügbaren Zeit von einer halben Stunde auch bei einiger Übung kaum mehr als 4 Ablesungen durchzuführen.

Daß auch alle anderen Fehlerquellen, die wir bei den anderen Methoden kennen lernten (wie z. B. Temperatur, Mischungsverhältnisse usw.) nicht geringer geworden sind, wird aus der kurzen Beschreibung der Methode hervorgegangen sein.

Ich gebe die durchschnittlichen Ergebnisse von Wasser, Serum und Tributyrin an, um die knappen Unterschiede aufzuzeigen, die kaum außerhalb des Fehlerbereichs liegen: Zum Durchtreiben einer Luftblase durch Wasser wurde (bei der Kapillare mit 1,5 mm Weite) ein Überdruck von 32 mm Wasser benötigt, durch Tributyrin 26 mm. Der Wert des Serums liegt dazwischen; aber selbst unvergiftet ist es innerhalb dieses kleinen Bereiches von 6 mm in seiner Spaltung nicht zu verfolgen. Dem Kapillarmanometer von 1 mm Weite entspricht ein Wasserwert von etwa 50 mm Überdruck Wasser. Doch genügt auch hierbei die Genauigkeit nicht zur Bestimmung vermehrter bzw. verminderter atr. Lipase.

Figur 3.

Kapillarmanometer



Zur Ermittlung der Serumlipase erscheint deshalb das Kapillarmanometer nach Czapek nicht geeignet.

Die Fettsäure als Maß der Serumlipase.

Im Folgenden will ich nun die Methoden besprechen, bei denen zur Ermittlung der lipolytischen Fähigkeit des Serums die Menge der bei der Fettspaltung frei werdenden Fettsäure dient.

1. Die titrimetrische Methode.

Die titrimetrische Methode wurde zur Bestimmung der Serumlipase wegen ihrer einfachen Ausführung von vielen Autoren angewandt. Die meisten bedienten sich der Methode nach Willstätter, bei der mit wechselndem p_H (beginnend im alkalischen und endend im sauren Gebiet) unter Aktivierung mit Kalziumchlorid und Albumin gearbeitet wird. Als Substrat dient Olivenöl. Die im Verlauf der Spaltung entstehende Fettsäure wird mit alkoholischer Kalilauge titriert.

Zur Ausführung bringt man (nach Orignalvorschrift) das Serum mit Wasser auf 10 ccm in eine weithalsige Flasche mit gut eingeschliffenem Glasstopfen von 30 ccm Fassungsvermögen. Dann gibt man 2,5 g Olivenöl und 2 ccm Pufferlösung (0,66 ccm n-NH_3 + 1,34 ccm n-NH_4Cl, d. i. p_H = 8,9 bei 30°) und 0,5 ccm 2% Kalziumchloridlösung und nach kurzem Durchschütteln 0,5 ccm 3% Albuminlösung hinzu. Die Mischung wird regelmäßig und kräftig 3 Minuten mit der Hand geschüttelt. Danach kommt die Emulsion bei 30° in den Thermostaten, wobei zu bemerken ist, daß die Emulsionsform selbst nicht etwa das Bedingende für die Spaltung ist und überhaupt die Emulsion nur von geringer Bedeutung für die lipolytische Wirkung ist. Die Bestimmung soll so eingerichtet werden, daß die Hydrolyse zwischen 10 und 24% fällt. Überschreitet die Spaltung 24%, so soll sie mit der halben Enzymmenge wiederholt werden. Die Reaktion durchschreitet nach 8,5% Spaltung den Neutralpunkt. Bei 24% Spaltung, dem Endpunkt der Spaltung ist p_H = 5,5.

Zur Titration der entstandenen Säure wird der Flascheninhalt mit 96% Alkohol in einen Erlenmeyerkolben gespült, so daß das Volumen der alkoholischen Flüssigkeit 125 ccm beträgt. Die Öltropfen, die noch an der Oberfläche schwimmen, löst man auf, indem man noch 20 ccm Äther zusetzt. Die Wirkung der Lipase wird hierdurch sistiert. (In nur alkoholischem Medium schreitet die Fermentwirkung noch langsam fort.) Als Indikator dienen 12 Tropfen einer 1% alkoholischen Lösung von Thymolphthalein, es wird mit 0,1 bis 1 n alkoholischer Kalilauge bis zu einem deutlich blauen Farbton titriert. Dabei werden außer der gebildeten Fettsäure auch die Salzsäure des Ammonchlorids und die amphotere Substanz der Proteingruppe aus der zu untersuchenden Substanz mittitriert. Der hierfür abzuziehende Alkaliverbrauch wird in einer entsprechenden Kon-

trolle ermittelt. (Der Alkaliwert des Puffers ist für 2 ccm Puffer 1,34 ccm n-Kalilauge.)

Mit dieser Methode wurden früher Messungen an unserer Klinik ausgeführt. Sie ist nicht so fein wie z. B. die stalagmometrische Methode — was besonders bei den minimalen Differenzen, die bei der atr. Lipase des Blutserums zu ermitteln sind, ins Gewicht fällt. Auch bietet es Schwierigkeiten, im Verlauf einer Spaltung mehrfache Messungen durchzuführen, die einerseits zur Ermittlung der erwähnten Unterscheidung von atr. Pankreas- und atr. Carzinom-Lipase (nach Bernhard) andrerseits zur Kontrolle wichtig sind. Schließlich ist (ebenso wie bei der folgenden gasanalytischen Methode) das Auftreten von saurem pH am Ende der Spaltung zu der Ermittlung dieser „Bernhardschen Kurve" ungeeignet, da freie Säure die weitere Spaltung hemmt — also stets ein Absinken der Kurve resultieren wird.

Auch andere Untersucher üben Kritik an der titrimetrischen Methode. So stellt Saxl bei seinen Autolyseversuchen fest, daß die mit der titrimetrischen Methode festgestellte Zunahme der freien Fettsäure kaum außerhalb der Fehlergrenzen liege. — Steudel setzt sich mit der Willstätterschen Modifikation der titrimetrischen Methode auseinander. — Nach Rona ist für die titrimetrische Methode ein Vielfaches der Lipasemenge nötig wie zur stalagmometrischen Methode.

Es sind von vielen Autoren andere Modifikationen ausgearbeitet, die unter anderem auch die Hemmung der Lipase durch Indikatoren, alkoholische Lösungen, pH der Untersuchungsflüssigkeit usw. ausschalten. Sie bezahlen ihre Verbesserungen durch vermehrte Kompliziertheit der Ausführung.

2. Die gasanalytische Methode.

Bei der gasanalytischen Methode messen wir die bei der Verseifung von Tributyrin gebildete Buttersäure dadurch, daß das Volumen einer durch die Säure aus einer Bikarbonatlösung ausgetriebene äquivalente Menge CO_2 manometrisch bestimmt wird.

Zur Messung des CO_2 bediente ich mich des Barcroftschen Blutgasmanometers (in der Warburgschen Modifikation) mit dem Reaktionsgefäß nach Nicolai (siehe Fig. 4). Das Manometer wird so an einem Thermostaten montiert, daß das Reaktionsgefäß vollständig in das Wasser taucht, während das außen befindliche Manometer an einer Schüttelvorrichtung angebracht ist. Die Schüttelvorrichtung stellte ich auf eine Tourenzahl von 80/Minute. Sie dient dazu, bei Änderung der Gasmassen in hoher Annnäherung ein Absorptionsgleichgewicht zwischen Gasraum und Flüssigkeit zu garantieren. Jedes Gefäß muß für sein Manometer genau und konisch eingeschliffen sein, ebenso jeder Hahn des Manometers. Darüber hinaus muß aber jeder Schliff sorgfältig eingefettet sein; das Fett soll frei von organischen Bestandteilen sein, weil sonst dadurch Fehler bei unserem Arbeiten entstehen; es darf nur wenig Fett aufgetragen wer-

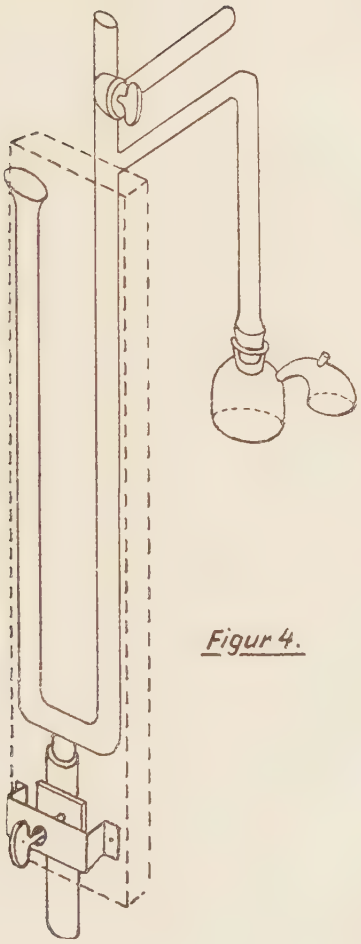
den, und beim Hineindrehen der Gefäße darf kein Fett in das Innere der Gefäße gelangen. — Als Sperrflüssigkeit des Manometers dient die Brodie sche Flüssigkeit; sie besteht aus 500 ccm Wasser, 23 g Kochsalz, 5 g gallensaurem Natron und ist zur Abhaltung von Bakterien mit so viel alkoholischer Thymollösung versetzt, daß sie deutlich nach Thymol riecht. Um die Brodie-Lösung besser sichtbar zu machen, kann man ihr Indigokarmin zusetzen. Die Manometer enden unten in einem Gummischlauch mit Druckschraube. Bei völlig gelöster Druckschraube soll die Flüssigkeit gerade im Anfangsteil des Manometers zu sehen sein, damit die ganze Skala ausgenutzt werden kann, bzw. andrerseits die Druckschraube ausreicht, die Flüssigkeit bis zur obersten Marke der Manometerskala zu bringen. Man füllt das Manometer mit der Brodie schen Flüssigkeit am besten auf die Weise, daß man den Druckschlauch abnimmt, ihn füllt und wieder ansetzt. Ist nun zu viel Flüssigkeit eingefüllt, so verschließt man den „Gefäßschenkel" des Manometers und schraubt die Lösung bis in den Trichteransatz des freien Schenkels hinauf, wo man sie mit Filtrierpapier absaugen kann. Sollten Luftblasen in die Manometerflüssigkeit gelangt sein, so sind sie durch geschicktes Hin- und Hermanipulieren mit Hilfe der Druckschraube gleichfalls in diesen Trichteransatz hinaufzubringen, wo man sie mit Hilfe eines Streichholzes zum Platzen bringen kann. Beim Nachfüllen der Gefäße goß ich stets die Flüssigkeit von oben hinein und entfernte die dabei immer auftretenden Luftblasen auf die angegebene Weise.

Der von mir benutzte Wasserthermostat wurde mit Gas beheizt und durch einen besonderen Thermoregulator auf gleichmäßiger Temperatur gehalten. Der Gaszufluß wird bei diesem durch einen Quecksilberfaden reguliert, der je nach der Temperatur des Bades die Gaszufuhr aus einer eintauchenden schräg abgeschliffenen Glasdüse mehr oder weniger frei gibt. Ich arbeitete bei 37,5° Wassertemperatur.

Etwa eine Stunde vor Beginn des Versuches muß das Wasserbad angeheizt werden, etwa ein Grad unterhalb der gewünschten Temperatur muß der Thermoregulator in Betrieb gesetzt werden.

Von einer Eichung der Gefäße kann man bei unseren Versuchen absehen. Die Gefäße haben zwar infolge ihres leicht differierenden Volumens eine verschiedene Gefäßkonstante. Doch empfiehlt es sich sowieso zur Selbstkontrolle bei den ersten Untersuchungen in mehrere Gefäße das gleiche Serum zu füllen; und aus den verschiedenen Untersuchungsdaten ergibt sich dann (auf ein Gefäß bezogen) eine sehr brauchbare Gefäßkonstante. So beschickte ich bei meinen ca. 40 Vorversuchen, die der Erlernung der Technik und dem Ausprobieren verschiedener Gefäßgrößen und verschiedener Flüssigkeitsmengen dienten, mehrere Gefäße mit der gleichen Lösung; und auch bei den ersten 20 Hauptversuchen füllte ich in je 2 Gefäße das gleiche Serum. Daraus ergaben sich sehr scharf um einen Wert schwankende relative Gefäßkonstanten.

Bei Herstellung des Serums müssen die bei der stalagmometrischen Methode erwähnten Vorschriften beachtet werden.



Figur 4.

Ferner sind folgende Vorbereitungen zu einem Versuche zu treffen: Die Reaktionsgefäße und ihre Stopfen werden einen Tag in Chromschwefelsäure-Gemisch eingelegt, mit Leitungswasser und danach mit destilliertem Wasser gut gespült und im Trockenschrank getrocknet.

Eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn ist das atoxylvergiftete Serum anzusetzen (s. stalagm. Methode). Ich verwandte (nach vielen Vorversuchen als günstigstes Mengenverhältnis festgestellt) 1 ccm Serum und 0,5 ccm 0,2% Atoxyl zu dem A-Versuch (atoxylvergiftetes Serum) und 0,5 ccm Serum zu dem K-Versuch (Kontrollversuch = unvergiftetes Serum).

Die zur Verdünnung und gleichzeitiger CO_2-Sättigung von Serum und Tributyrin notwendige Ringerlösung ist regelmäßig frisch herzustellen. Ich verwandte (ebenso wie Rona, Warburg) 100 ccm 0,9% NaCl- + 2 ccm 1,2% KCl- + 2 ccm 1,76% $CaCl_2$- + 20 ccm 1,26% $NaHCO_3$-Lösung; im Verlauf meiner Untersuchungen ergab es sich als zweckmäßig, durch die Lösung 10 Minuten lang ein Gasgemisch von 5 Vol.-Prozent Kohlensäure + 95 Vol.-Prozent Stickstoff zur völligen Sättigung mit CO_2 hindurchzuleiten.

Von dieser Ringerlösung schüttelte ich 10 ccm mit 30 Tropfen (= 1 ccm) Tributyrin kräftig mit der Hand. Je 10 ccm gab ich dem Serum und dem Serum-Atoxyl zu.

Jetzt beschickte ich die kleinen Kammern aller Reaktionsgefäße mit 1 ccm (verdünntem) Tributyrin und die große Kammer je eines Gefäßes mit 1 ccm (verdünntem) Serum bzw. Atoxyl-Serum. Zur Berücksichtigung von Temperatur- und Barometerschwankungen wird ferner statt des Serums in ein Gefäß 1 ccm Ringerlösung pipettiert (= Thermobarometer).

Nun werden die Gefäße sorgfältig an dem (eingefetteten) Konus des Manometers angebracht und mit Spiralfedern befestigt. Um die Luftsäule des Manometers weitgehend durch CO_2-N-Gemisch zu ersetzen und auch eine völlige CO_2-Sättigung der Flüssigkeiten zu erhalten, leitete ich durch den rechten Schenkel (d. i. der mit dem Hahn versehene Schenkel) des Manometers das CO_2-Gemisch ein und ließ den lose aufgesetzten Stopfen des Reaktionsgefäßes auf dem austretenden Gasgemisch tanzen. Man muß bei dem Einleiten des Gases sehr vorsichtig zu Werke gehen, da sonst die Brodie-Lösung aus dem linken Manometerschenkel herausgedrückt wird. Man kann es stets vermeiden, wenn unter Beobachtung der Manometerflüssigkeit ganz langsam den Zustrom des Gases steigert. Spert man am Schluß den Gaszustrom durch den Dreiwegehahn des Manometers ab, so fällt der (vorher eingefettete) Stopfen des Reaktionsgefäßes sofort von selbst herab und verhindert in den nun abgeschlossenen Manometerraum ein Nachdringen von Luft. Der Stopfen wird dann sofort fest eingedreht und durch Gummiverschnürung befestigt.

Bei dem nun folgenden Einsetzen der Gefäße in das Wasserbad kommt wieder ein für den Anfänger kritischer Moment: infolge der Erwärmung und Ausdehnung des Gases wird der linke Manometerschenkel sehr rasch

hochgedrückt. Um ein Herausschießen der Brodie-Flüssigkeit zu vermeiden, muß deshalb kurz nach dem Einsetzen der Dreiwegehahn für einen Augenblick geöffnet werden, so daß die überflüssige Gasmenge abströmt, aber ohne daß Luft hineinströmt.

Zum völligen Temperaturausgleich wird nun für etwa 5 Minuten der Schüttelapparat in Betrieb gesetzt (vorsichtig, damit nicht jetzt schon Lipase und Tributyrin zusammenfließen). Ist so der Manometerstand völlig konstant geworden, so wird die Brodie-Lösung in dem rechten (geschlossenen) Manometerschenkel auf einen stets gleichen Wert eingestellt (ich nahm 50,0). Und auch die linke (offene) Flüssigkeitssäule wird durch kurzes Öffnen des Dreiwegehahnes möglichst tief gebracht, damit zur Ablesung nachher der ganze Manometerschenkel zur Verfügung bleibt.

Nun werden das Tributyrin und Serum (bzw. Atoxyl-Serum, bzw. Ringerlösung) zusammengeschüttet. Da dazu das Manometer abgenommen, also das Gefäß aus dem 37,5 warmen Wasserbade genommen werden muß, kommt es wieder unter den Einfluß niedrigerer Temperatur und saugt die Brodie-Lösung in dem geschlossenen Schenkel hoch. Es muß deshalb sehr rasch und trotzdem exakt umgeschüttet werden: ich goß dreimal rasch hin und her. Es ist zu empfehlen, dabei den freien Schenkel des Manometers mit dem Finger zu verschließen. Das außerdem von Rona vorgeschlagene feste Andrücken des Reaktionsgefäßes an das Manometer halte ich bei richtiger Befestigung für überflüssig.

Da die danach sofort vorgenommene Ablesung noch stark unter dem Einfluß der Temperaturschwankung steht, verwandte ich erst den nach 10 Minuten abgelesenen Wert. Bei jeder Ablesung wird der rechte Schenkel wieder auf den ursprünglichen Wert eingestellt (50,0) und die Höhe des linken Schenkels durch Spiegelablesung zur Vermeidung von Parallaxefehlern abgelesen. Man läßt also das Volumen des Gases stets gleich und ändert nur den Druck. Da man diesen Druck aber kurz vor der Ablesung zum Nivellieren des rechten Schenkels erhöht, erhöht man auch den Partiardruck des Gases im Gasraum und ändert den Partiarlösungsdruck in der Flüssigkeit. Infolgedessen schwankt die Manometersäule bis zur Einstellung ihrer Gleichgewichtslage noch einen Augenblick leicht. Diese momentane Schwankung muß abgewartet werden, vor allem natürlich bei den starken Ausschlägen der unvergifteten Lipase.

Ich nahm alle 10 Minuten eine Ablesung vor, um einen genauen Zeit-Spaltungsverlauf zu erhalten. Es genügt selbstverständlich alle halbe Stunde eine Ablesung vorzunehmen (s. stalagmometrische Methode).

Der Schüttelapparat ist i. A. für 6 Manometer eingerichtet. Da man ein Thermobarometer und zu einer Serumuntersuchung mindestens je zwei Manometer benötigt, kann man also nur 2 Seren gleichzeitig untersuchen. Und da man 12 Stunden zur Säuberung der Reaktionsgefäße braucht, sind diese 2 Versuche die einzigen, die man innerhalb eines Tages vornehmen kann. Aber selbstverständlich könnte man bei Bedarf größere Apparate

bauen, so daß die Zahl der Seren, die man innerhalb einer halben Stunde ablesen könnte, nur durch die Ablesezeit beschränkt würde und sich auf etwa 10 (also 20 Ablesungen) belaufen könnte.

Die Genauigkeit der gasanalytischen Methode übertrifft alle anderen Methoden. Sie erlaubt je nach Größe des Gefäßvolumens und der Menge der eingefüllten Flüssigkeit das Entstehen oder Verschwinden eines Gases mit einem Fehler ± 0,5 bis ± 0,05 ccm festzustellen. Umgerechnet auf Massen entsprechen diese Fehler einer Größenordnung von 10^{-6} bis 10^{-8} g je nach der Natur des Gases (nach R o n a). Diese außerordentliche Empfindlichkeit der Methode bedingt eine ebenso große Sorgfalt bei der Behandlung der Apparatur, der Vorbereitung der Versuche und der Ausschaltung bzw. äußersten Vermeidung aller nur möglichen Fehler.

Neben der sorgfältigsten Pipettierung bei Herstellung der einzelnen Lösungen, genauester Beachtung der oben angegebenen Zeiten und Kunstgriffe zur Inbetriebnahme des Apparates ist vor allem auch die Temperatur als Fehlerquelle auszuschalten. Das Wasserbad mit Hilfe des Thermoregulators auf konstanter Temperatur von $37{,}5^0$ zu halten, macht keine sonderlichen Schwierigkeiten. Doch spielt auch die Außentemperatur eine nicht zu unterschätzende Rolle, da ja das ganze Manometer sich außerhalb des Wassers befindet. Und die verschiedene Ausdehnung des Gases im Manometer macht sich bei dem feinen Instrument sehr wohl bemerkbar. Zwar werden Schwankungen während des Versuches sehr gut durch das Thermobarometer angezeigt, aber dadurch sind noch nicht Vergleichsbedingungen zwischen 2 Versuchen gegeben, die bei verschiedenen (mittleren) Temperaturen ausgeführt wurden. Auch erhielt ich sogar verschiedene Thermobarometerwerte, wenn ich bei kühler Witterung das Fenster offen ließ und ein Thermobarometer fensterwärts, eins zimmerwärts anbrachte. Darüber hinaus ist ferner die Eintauchtiefe der Reaktionsgefäße in das Wasserbad von entscheidender Bedeutung. Der Wasserbottich muß bis an den Rand gefüllt sein, so daß die Gefäße vollständig eintauchen; die Ablesung habe ich stets in Schrägstellung der Manometer (bis zur äußersten Amplitude des Schüttelapparates) vorgenommen, damit die Eintauchtiefe bei der Ablesung der beim Schütteln entsprach. In Geradstellung sank die Manometersäule. Es ist nach diesen Ausführungen selbstverständlich, daß das Gefäßansatzrohr möglichst gleich lang bei allen Manometern sein soll. Als nach einer Reparatur ein Ansatzrohr bei unserem Apparat verkürzt werden mußte, ergab dieses Manometer ganz andere Werte.

Ebenso ist natürlich der Barometerstand von Bedeutung für unsere Messungen, da wir ja als Maß der Gasmenge den Druck benutzen, der die vermehrte Gasmenge auf dem gleichen Volumen hält. (Bekanntlich ist dieser Druck proportional der Gasmenge.) Und auf diesem Überdruck lastet — durch den freien Manometerschenkel übertragen — der Atmosphärendruck. Auch hier werden nur die Druckschwankungen während eines Versuches durch das Thermobarometer ausgeglichen, d. h. auf den Barometerstand im Anfang der Messung bezogen. Verschiedener Barometeranfangs-

stand bei zwei Versuchen muß also bei einem Vergleich der beiden Versuche berücksichtigt werden.

Bei Berücksichtigung aller angegebenen Kunstgriffe zur Ausschaltung von Fehlerquellen können die Fehler unter 1% gehalten werden.

In Tabelle 6 gebe ich ein Beispiel eines Versuches, um die rein praktische Ausführung der gasanalytischen Methode zu demonstrieren.

Tabelle 6.

Versuchsdaten einer Lipasebestimmung mit der gasanalytischen Methode.

Zeit in Min.	Temperatur in °C	1	3	4	5	6
		Gk. = 0,0000	Gk. = 0,0000	Gk. = 1,0756	Gk. = 0,9469	Gk. = 1,0445
		Thermobarometer	A_1	K_1	A_2	K_2
		1 Ringer	1 Serum-Atoxyl	1 Serum	1 Serum-Atoxyl	1 Serum
		—	—	—	—	—
		1 Tributyrin	1 Tributyrin	1 Tributyrin	1 Tributyrin	1 Tributyrin
vor Umsch.	37,10	46,0	59,0	47,0	34,5	38,5
10	37,30	61,0	79,0	101,5	54,5	84,5
		−0,5	4,5	36,0	3,0	24,0
20	37,29	60,5	83,0	137,0	57,0	108,0
		1,5	6,0	36,5	5,0	26,5
30	37,30	62,0	90,5	175,0	63,5	136,0
		2,0	8,5	34,5	5,5	26,0
40	37,31	64,0	101,0	211,5	71,0	164,0
		−0,5	7,0	33,0	4,5	25,0
50	37,31	63,5	107,5	244,0	75,0	188,5
		4,0	8,5	35,5	7,0	24,0
60	37,39	67,5	120,0	283,5	86,0	216,5
		1,0	7,5	33,5	4,0	22,0
70	37,39	68,5	128,5	318,0	91,0	239,5
		1,5	7,0	(48,5) 33,0	5,5	25,5
80	37,39	70,0	137,0	(84,0)	98,0	266,5
		2,0	7,0	33,0	5,0	24,0
90	37,39	72,0	146,0	(119,0)	105,0	292,5
		11,0	67,0	287,0	50,5	208,0
			11,0	11,0	11,0	11,0
			56,0	276,0	39,5	197,0
			·Gk.	·Gk.	·Gk.	·Gk.
			56,0	296,9	37,4	205.8

Die Gefäßkonstanten wurden (wie ersichtlich) auf Gefäß 3 bezogen. Die Zahlen neben den abgelesenen Werten geben die einzelnen Teildifferenzen nach Berücksichtigung des Thermobarometers an. Nach Beachtung

des Barometerstandes von 768,0 mm Hg und der Außentemperatur von 19° C ergeben sich als endgültige Werte:

Serum 1: $A_1 = 53{,}8$ $K_1 = 285{,}0$ bei 760 mm Hg und 20° C.
Serum 2: $A_2 = 35{,}9$ $K_2 = 197{,}5$ bei 760 mm Hg und 20° C.

Die atr. wie Gesamtlipase des ersten Patienten ist deutlich erhöht, die des zweiten normal. Man muß nämlich bei meiner Versuchsanordnung von etwa 50,0 an die atoxylvergiftete Lipase, von etwa 200,0 an die Gesamtlipase als erhöht bezeichnen; das ist z. B. auch durch den Vergleich mit den stalagmometrisch gewonnenen Werten aus den folgenden Tabellen abzulesen. — Zu diagnostischen Zwecken darf natürlich nicht starr nur ein Über- oder Unterschreiten dieser Grenzwerte bewertet werden; vielmehr ist die Relation zwischen Gesamtlipase und atr. Lipase bei nicht sehr ausgesprochener Vermehrung oder Verminderung weigehend entscheidend (s. auch S. 4).

In Tabelle 7 bis 9 führe ich eine Reihe von Untersuchungsergebnissen an, die mit der gasanalytischen Methode von mir gewonnen wurden; ich setze sie in Vergleich zu stalagmometrisch ermittelten Werten, die gleichzeitig von unserer Laborantin festgestellt wurden — absichtlich ohne die gegenseitigen Ergebnisse vor Beendigung beider Versuche zu kennen. Man erkennt aus dem Vergleich die weitgehende Übereinstimmung beider Untersuchungsmethoden und die viel feineren Ausschläge der gasanalytischen Methode. Ferner zeigen die Tabellen einige Untersuchunngsergebnisse der gleichzeitig in unserer Klinik ausgeführten Carzinomreaktionen nach Fuchs und nach Botelho. (Ich mache jedoch darauf aufmerksam, daß die Botelhosche Reaktion sehr unsicher ist.)

In Tabelle 7 habe ich die Lipasewerte von Carzinomkranken aufgenommen; die Diagnose wurde durchgehend autoptisch oder bioptisch bestätigt. Die ersten fünf Werte zeigen eine ausgesprochene Erhöhung der atr. Lipase, während die Gesamtlipase bei 4 schon etwas, bei 5 bereits stark abgesunken ist. 2 und 3 zeigen Rezidive nach alten Mammaamputationen. 5 ist insofern interessant, als der Patient wegen Pankreastumors eingewiesen war. Nach dem niederen Gesamtlipasewert im Verhältnis zur Erhöhung der atr. Lipase erschien eine Beteiligung des Pankreas als unwahrscheinlich; die Operation ergab dann auch, daß es sich um ein Magen-Netz-Carzinom handelte. 6 ist einer der Werte, die nicht als Carzinom zu diagnostizieren sind; beide Lipasewerte sind normal, und in diesem Falle ist auch die Gesamtlipase nicht früher abgesunken als die atr. Lipase. 7 zeigt ein Absinken beider Werte, wie es für ein altes Car. typisch ist. 8 bis 10 sind schließlich Untersuchungsergebnisse, die nach radikaler Entfernung des Tumors gewonnen wurden; der nicht erhöhte Wert der atr. Lipase zeigt die totale Entfernung des Tumors an und läßt einen gewissen Schluß auf spätere Rezidivfreiheit zu. 8 ist insofern interessant, als die vor der Operation vorgenommene stalagmometrische Untersuchung eine starke Er-

höhung der atr. Lipase anzeigt, die jetzt (gasanalytisch gemessen) nach der Operation zu normalen Werten zurückgekehrt ist.

Tabelle 7.

Serumlipase Karzinomkranker.

Nr.	Alter	Sitz des Carzinom	Operation	Tage nach Op.	E. Z.	gasanalytisch		stalagmometr.		Fuchs R	Botelho	Bemerkung
						A	K	A	K			
1	29	Cancroid	Teil-Exz.	14	sehr gut	85,0	359,8	6	34	+	—	stalagm. 12 35 vor 5 Tagen
2	61	Mamma	Ablatio	113	adipös	83,5	339,3					
3	37	Mamma	Amputatio	530	gut	56,0	276,0	8	20			
4	39	Rektum	—		gut	68,5	178,3	6	21	+		
5	62	Magen, Netz	—		mäßig	60,6	128,2	5	19		+	
6	59	Blase	—		mäßig	37,4	191,3	4/5	13		+	
7	57	Magen	—		schlecht	14,7	72,8	4	10		+	stalagm.
8	66	Haut	Exzision	8		42,0	161,1	(10	26)		+	9 Tage vorher unters.
9	55	Prostata	Ausschälung	13	reduziert	40,0	94,5	6	12		+	
10	61	Magen	Billroth 2	8	mäßig	43,0	90,2	2/3	9			

Tabelle 8.

Serumlipase bei Erkrankung der Gallenblase.

Nr.	Alter	Art der Gallenblasenerkrankg.	Operation	Tage nach Op.	E. Z.	gasanalytisch		stalagmometr.		Botelho	Bemerkung
						A	K	A	K		
1	29	Rezidivbeschwerd.	Cholezystektomie	5 J.	gut	61,5	171,0	6/7	22		Urinlipase spricht für Pankr.erkr.
2	26	„	„	1 J.	gut	57,7	182,0	6	23		
3	28	Cholelithiasis	—		sehr gut	58,7	178,2	5/6	16	—	
4	46	„	„	44	gut	49,5	108,0	5	11	+	
5	40	„	—		mittel	15,0	115,3	4/5	10		
6	36	Cholezystitis	—		gut	41,0	205,1				
7	56	Empyem	„	23	gut	39,3	83,5	5	12		
8	61	„	„	5	leidlich	45,0	120,0	4/5	13	—	
9	57	Carzinom	—		schlecht	14,7	72,8	4	10		

In Tabelle 8 führe ich Untersuchungsergebnisse von Patienten an, die an einer Gallenblasenerkrankung leiden. Ich habe sie gesondert angeführt, da oft ein Gallenleiden zu einer Mitbeteiligung des Pankreas führt, was sich dann in einer Erhöhung sowohl der atr. wie der Gesamtlipase ausdrückt. Nur bei den ersten drei angeführten Patienten ist hier an eine leichte Pankreasaffektion zu denken, da nur diese eine leichte Erhöhung

beider Lipasewerte zeigen. Der letzte Wert stammt von einem Patienten mit Pankreas-Carzinom, der schon in kachektischem Zustande ist und deshalb die niedrigen Werte aufweist.

Tabelle 9.

„Normal"-Seren bei verschiedenen Erkrankungen.

Nr.	Alter	Diagnose	Operation	Tage nach Op.	E. Z.	gasanalytisch		stalagmometr.		Botelho
						A	K	A	K	
1	55	Prostatahypertr.	—		reduziert	49,0	142,0	4	21	+
2	47	Leberverwachsung	—		„	30,0	108,8	4	18	
3	62	Prostatahypertr.	Prostatektomie	4	mäßig	33,5	115,8			
4	41	Colitis	—		„	38,7	109,7	4	15	
5	20	Idiotie	Sterilis.	11		51,0	122,5	5	17	
6	52	Prostatahypertr.	—		ausreich.	41,2	111,7	6	15	+
7	18	Dermoidzyste	Extirpatio	15	gut	35,5	94,7	3	16	
8	76	Prostatahypertr.	—		schlecht	35,5	69,0	3/4	13	+
9	47	Basedow	Strumekt. halbseitig	60	gut	51,0	127,2	6	17	+
10	40	„	—		leidlich	96,0	334,5	7/8	32	+

Tabelle 9 zeigt „Normalseren" bei verschiedenen — bezüglich der Lipase „unspezifischen" — Erkrankungen. Die beiden letzten Werte stammen von Basedow-Patienten, bei denen sowohl atr. wie Gesamtlipase erhöht sind (wie früher schon B e r n h a r d und andere Forscher festgestellt haben). Sie wurden hier vor allem untersucht, um die Übereinstimmung zwischen stalagmometrischer und gasanalytischer Methode zu demonstrieren.

Auf die in den Tabellen angeführten Carzinomreaktionen nach B o t e l h o und F u c h s möchte ich nicht näher eingehen. Ich möchte nur bemerken, daß die F u c h s sche Reaktion recht zuverlässige Werte ergibt, und möchte deshalb auf die angeführten Orignalarbeiten von F u c h s und die Arbeiten von K ö h l e r verweisen. — Den Ernährungszustand des Patienten habe ich angegeben, weil ich erwartete, daß entsprechend der Verschlechterung des Ernährungszustandes auch die Lipasewerte abnehmen; denn bei kachektischen Individuen ist die Lipase vermindert (s. S. 3). Nun ist auch in meinen Tabellen ersichtlich ein gewisser Zusammenhang zwischen E. Z. und Lipasewert festzustellen (s. z. B. Tab. 9 Nr. 8), doch müßte man zur näheren Feststellung die Größen-Gewichts-Relation in Beziehung zu den Lipasewerten setzen.

Kritische Übersicht

über die gasanalytische Methode, verglichen mit der stalagmometrischen Methode.

1. Die Anschaffungs- und Betriebsunkosten sind weit höher als die der stalagmometrischen Methode.
2. Die Empfindlichkeit ist sehr groß und übertrifft weit die stalagmometrische Methode.
3. Die größere Empfindlichkeit erfordert eine weit sorgsamere Vorbereitung und Handhabung der Versuchsanordnung. Nur zuverlässige Ausübung von geübter Hand ergibt brauchbare Werte.
4. Die Fehlergrenze beträgt etwa 1%.
5. Infolge der umständlicheren Vorbereitung und komplizierteren Handhabung ist die Versuchsdauer 1—1½ Stunden länger als bei der stalagmometrischen Methode.
6. Die Ablesung ist sehr schnell vorzunehmen (i. G. stal. Methode).
7. Bei der Ablesung ist ein persönlicher Fehler ausgeschlossen (i. G. stal. Methode), wenn beschriebene Nachschwankung und richtiges Eintauchen der Reaktionsgefäße beachtet wird.
8. Absolute Entfettung der Gefäße ist Vorbedingung für einen einwandfreien Versuch.
9. Temperatur des Wasserbades und auch des Untersuchungsraumes sind infolge der Wärmeausdehnung des entstehenden Gases von größerer Bedeutung als bei der stalagmometrischen Methode.
10. Vor der ersten Zählung ergibt nicht genügend langes Warten bis zum völligen Temperaturausgleich falsche Werte.
11. Beim Umschütten der Gefäße entsteht eine Fehlerquelle, wenn Flüssigkeit in den Manometerschenkel gelangt.
12. Luftblasen in der Brodielösung fälschen den Wert.
13. Unvollkommene CO_2-Sättigung der Untersuchungslösungen und des geschlossenen Manometerschenkels erniedrigen die Werte. Ja, es kann infolge dieser CO_2-Absorption ein negativer Wert resultieren.
14. Die Herstellung der Tributyrinemulsion kann (i. G. zur Tributyrinlösung bei der stal. Methode) keine Fehlerquellen ergeben, da es auf die Feinheit und das Mengenverhältnis bei der Emulsion wenig ankommt.
15. Zu altes Tributyrin täuscht infolge schnellerer Spaltung erhöhte Werte vor.
16. entsprechend stal. Methode Punkt 14.
17. entsprechend stal. Methode Punkt 15.
18. entsprechend stal. Methode Punkt 16.
19. Jedes Reaktionsgefäß und jedes Manometer ergibt infolge kleinster Volumunterschiede einen bestimmten Wert, der durch Feststellung der Gefäßkonstante auf ein Gefäß bezogen werden muß.

20. Man kommt mit 1 ccm Serum (i. G. st. Methode 3 ccm Serum) und auch sonst geringerer Flüssigkeitsmenge aus.
21. Verdampfung von Gasen, Verunreinigung der Luft, Viskosität und spezifisches Gewicht können keine Veranlassung zu Fehlern geben (i. G. stalagmometrische Methode).
22. Höherer Barometerstand ergibt niedrigere Werte, so daß also eine entsprechende Korrektur vorgenommen werden muß.

Ein Vergleich zwischen gasanalytischer und stalagmometrischer Methode ergibt also, daß die gasanalytische Methode aus verschiedensten Gründen genauer, aber auch diffiziler als die stalagmometrische Methode ist. Insbesondere ist das Ablesen schneller und exakter auszuführen, aber die Vorbereitungen erfordern viel mehr Zeit.

C. Allgemeine Methodik und Wirkungsweise der Lipase.

Bei sämtlichen Verfahren ist zur Beurteilung der lipolytischen Spaltfähigkeit eines Serums notwendig, die Serumlipase eineinhalb Stunden auf das Tributyrin einwirken zu lassen. Die Versuchsdauer ist also — ganz abgesehen von der zur Vorbereitung erforderlichen Zeit — sehr hoch. Denn wenn eine schnelle Diagnose (etwa bei akuter Pankreasnekrose) erforderlich ist, so wäre wohl ein großer Teil der Versuchsvorbereitungen schon für solche Fälle vorwegzunehmen; aber trotzdem ist die Versuchsdauer nicht unter 2 Stunden zu senken. Deshalb wurde von verschiedenen Autoren versucht, durch Aktivatoren die Lipasewirkung zu beschleunigen. So gibt Rosenow an, daß nach Zusatz von 30 mg Leucyl-glycyl-glycin ein atoxylvergiftetes Serum schon nach 5 Minuten den Wert erreicht, wie sonst nach 60 Minuten. Willstätter und Memmen geben eine Erhöhung der lipatischen Wirkung durch 30mg Leucyl-glycyl-glycin um 600% an. Da eine solche Versuchsbeschleunigung von großem Vorteil für die Lipaseuntersuchungen wäre, versuchte auch ich das Leucyl-glycyl-glycin zur Aktivierung zu benutzen. Doch kann ich (von einer geringfügigen Erhöhung abgesehen) obige Ergebnisse nicht bestätigen *).

Ein weiterer störender Faktor bei der diagnostischen Verwendung der Lipaseuntersuchung im Blutserum ist der Umstand, daß sich bei manchen Erkrankungen eine gegen das gleiche Gift resistente Lipase findet wie bei anderen Erkrankungen. So ist vor allem die atr. Pankreaslipase von der atr. Carzinomlipase im Frühstadium des Carzinoms nicht zu unterscheiden (während in den späteren Stadien des Car. ja im allgemeinen das Verhältnis von Gesamtlipase zu atr. Lipase kleiner wird). Bernhard fand häufig eine Zunahme der Spaltfähigkeit in der dritten halben Stunde

*) Auf eine Anfrage bei dem Autor erhielt ich keine Antwort.

bei Carzinomseren, während eine Abnahme bei Pankreasseren häufig ist. Diese Feststellung wurde in großen Versuchsreihen für etwa jeden 3. Fall von Köhler mit der stalagmometrischen Methode bestätigt. Auch ich nahm deshalb jede halbe Stunde, bei der gasanalytischen Methode sogar alle 10 Minuten eine Ablesung vor. Ich hoffte, vor allem mit der empfindlicheren gasanalytischen Methode in dieser Richtung einen genaueren Einblick in den Spaltungsablauf zu gewinnen, da die Stalagmometrie solche feinen Unterschiede nicht mit absoluter Sicherheit erkennen läßt. Doch erwies sich die gasanalytische Methode in meiner Anordnung nicht als brauchbar für diese Nachprüfung. Die lipolytische Fähigkeit zeigte im Verlauf eines Versuches stets eine leichte Tendenz zum Absinken. Ich führe das auf die hemmende Wirkung der freiwerdenden Säure zurück und halte deshalb nur eine gepufferte Lösung für geeignet, diese praktisch wichtige Eigenschaft der Seren einer Prüfung zu unterziehen.

Es erhebt sich überhaupt in diesem Zusammenhange die Frage nach der **Spezifität und der Wirkungsweise der Lipase.**

Verständlich erscheint, daß eine größere Serummenge (also Lipasemenge) größere lipolytische Fähigkeit hat als eine kleinere Serummenge, wie es aus meinen Versuchen deutlich hervorgeht und die (nach Willstätter) für einen gewissen Bereich sogar eine direkte Proportionalität zeigt.

Doch woran liegt es, daß die gleiche Serummenge bei verschiedenen Erkrankungen gegenüber dem Gesunden eine Erhöhung bzw. eine Erniedrigung ihrer lipolytischen Fähigkeit hat und für bestimmte Gifte weitgehend gewebsspezifisch vergiftbar, für andere resistent ist. — Es kann sich demnach doch nicht nur um ein vermehrtes (oder vermindertes) Übertreten von gleichartiger Lipase handeln, sondern es muß die Lipase als nicht einheitlicher Körper angenommen werden. Andrerseits will es aber nicht recht einleuchten, daß es verschiedene Lipasen im menschlichen Körper geben soll — und diese in ihrer Struktur verschiedenen Lipasen jeweils an bestimmte Organe gebunden sein sollen. Auch liegen Beweise vor, daß ein und dieselbe Lipase durch Zugabe gewisser Stoffe in ihrer Vergiftbarkeit und Spaltfähigkeit geändert werden kann (s. u.).

Diesen scheinbaren Widersprüchen wird eine neuere Anschauung über die Struktur der Lipase gerecht (Willstätter, Kraut, Oppenheimer): Jedes Enzym besteht aus einem „Symplex", der aus eigentlicher Wirkgruppe (Agon) und einem speziell zu ihm gehörigen Träger kolloidaler Natur (Pheron) dargestellt wird. Pheron, Agon und Symplex stehen ähnlich dem Massenwirkungsgesetz in einer Relation:

$$k = \frac{(\text{Agon})\ (\text{Pheron})}{(\text{Symplex})}.$$

Agon ist die Lipase im engeren Sinne. Ohne an ihr Pheron (also bestimmte, für sie spezifische Eiweißkörper) gebunden zu sein, ist sie aber

unwirksam, ebenso wie man eine Säuregruppe noch nicht als Säure bezeichnen kann. Und wie dort die Dispersität den Grad der Säure angibt, bestimmt hier die Dispersität die Aktivität der Lipase. Analog bedingt der Überschuß an freiem Pheron die Stabilität des Enzyms (Symplex).

Das Agon (die Lipase i. e. S.) ist in diesem Symplex stets als der gleiche Körper zu denken, während das Pheron — der kolloidale Träger — verschieden ist und dem Symplex seine Eigenart — seine Organspezifität — verleiht.

Neben diesem eigentlichen Symplex sind noch zu dem System gehörige notwendige Begleitstoffe vorhanden, die nach Kraut in der Hauptsache aus Pheron selbst im Überschuß bestehen. Ferner sind außerdem akzessorische Begleitstoffe — das „Milieu" — von großer Bedeutung für die Wirkungsweise; man kann sie durch die normalen Reinigungsprozesse entfernen.

Viele Versuche bestätigen diese Anschauungen. So wird nach einem Befunde von Virtanen intravenös eingespritzte Pankreaslipase in der Leber gespeichert und dort zu Leberlipase umgewandelt. D. h. es wird die Wirkgruppe der Pankreaslipase auf das „Lebersystem" umgeschaltet, die gesamte Leberlipase wird einheitlich: Hemmung durch Atoxyl, Resistenz gegen Chinin. Das spricht also dafür, daß das Agon (Wirkgruppe) stets einheitlich ist und nun bei Speicherung in der Leber an den kolloidalen Träger der Leber gebunden wird.

Nach Kraut ist die Leberlipase stabil, weil sie viel freies Pheron enthält, während umgekehrt Pankreaslipase (nach Verdünnung mit Wasser) labil ist infolge reichlich vorhandenen Symplexes mit relativ geringem Gehalt an freiem Pheron. Durch Zusatz von freiem Pheron aus Leberlipase zu frischer Pankreaslipase ist diese auf Leberlipase umzuschalten: es handelt sich nicht um eine Aktivierung, sondern um eine Neubildung von Leberlipase. Dasselbe läßt sich auch umgekehrt erreichen. Es ist damit die Grundanschauung Willstätters gesichert, daß alle Lipasen dieselbe Wirkgruppe enthalten und sich nur durch Eigenarten des Trägers unterscheiden.

Neben der Eigenart des engeren Systems ist — wie gesagt — für die Wirkungsweise der Lipase das Milieu der akzessorischen Begleitstoffe von entscheidender Bedeutung. Dafür sprechen eine große Zahl von Versuchen (Rona, Ammon, Willstätter, Gyotoku, Wohlgemut, Zummo, Bamann), die eine weitgehende Änderung der Lipasewirkung bzgl. der Vergiftbarkeit usw. bei Reinigung des Milieus zeigen. Willstätter fand beim Vergleich von Magen- und Pankreaslipase, daß die Aktivitäts-p_H-Kurve stark von „Aktivatoren und Hemmungskörpern" abhängt und daß die diesbezüglichen Unterschiede zwischen beiden Fermenten mit steigendem Reinheitsgrade immer geringer werden. — Es ist nach diesen Versuchen sicher, daß sich die Giftwirkung (Atoxyl, Chinin usw.) in der Hauptsache auf das Milieu im weiteren Sinne, auf die

akzessorischen Begleitstoffe richtet. Wie weit die Gifte auch auf Symplex und das engere System einwirken, ist nicht sicher.

Einen weiteren Einblick in die Wirkungsweise der Lipase gibt die „Aktivierung", d. h. Änderung der Wirkungsstärke ohne Änderung der gewebsspezifischen Vergiftbarkeit. Die Aktivierung durch unspezifisches Albumin ist (nach K r a u t) derart zu deuten, daß dies nun als Pheron-Ersatz eintritt und neuen Symplex mit vorher trägerlosen (also unwirksamen) Agon bildet. Nach R e m e s o w machen die Lipoide des Serums das Enzym bis auf 20% unwirksam (nur in vivo, nicht in vitro). Wollte man diese Tatsache auch als neue Symplexbildung aus Agon und Lipoiden deuten, so müßte man eine Verdrängung des ursprünglichen Pherons durch das neue Pheron Lipoid annehmen und dieser neue Symplex müßte eine sehr geringe Aktivität (oder Dispersität) haben. R e m e s o w erklärt diese Hemmung durch Adsorption des Enzyms an die Lipoide und sieht in der Aktivierung der Lipase durch Phosphate, Kalziumoleat usw. eine Zerlegung des Adsorbates. Er erzeugte künstlich in vivo eine Hemmung durch i. v. einverleibtes kolloidales Cholesterin. — Auch andere Momente sind sicher für Aktivierung und Hemmung maßgebend. So möchte ich auf die toxische Wirkung hormonaler Einflüsse (s. Schilddrüse S. 2) und auch auf die Beeinflussung des zu spaltenden Körpers hinweisen (s. z. B. S. 17: beschleunigte Spaltung älteren Tributyrins).

Für diagnostische Untersuchungen wäre es von entscheidender Bedeutung, tiefer in alle diese Probleme einzudringen. Wissen wir doch nicht einmal, ob es sich beim Auftreten gewebsspezifischer Lipase im Blutserum um tatsächliches Ausschwemmen von Gewebslipase (im Verband des ganzen Symplex) handelt. Denn nach allen erwähnten Versuchen ist es durchaus nicht ausgeschlossen, ob nicht nur kolloidale Stoffe dieses Organs ausgeschwemmt werden, die entweder als Pheron oder durch Änderung des Milieus der akzessorischen Begleitstoffe eine spezifische Änderung der Blutlipase bedingen. Es braucht sich aber nicht um eine Ausschwemmung kolloidaler Träger aus dem erkrankten Organ zu handeln, sondern infolge von vermehrt ausgeschwemmten Hormonen oder durch den Krankheitsprozeß entstandener Abbauprodukte kann man sich eine Vermehrung der Bluteiweißkörper aus anderen Organen denken, die nun wiederum eine bezüglich ihrer Vergiftbarkeit spezifische Lipase erzeugen. Schließlich ist es durchaus nicht ausgeschlossen, daß die Aktivierung oder Hemmung ein völlig gleichartiger, nur unspezifischer Prozeß ist. Andrerseits müßte aber eine Adsorption (wie sie bei Schwangerschaft infolge des vermehrten Cholesterins analog den Versuchen R e m e s o w s wahrscheinlich ist) oder eine hormonal-toxische Wirkung (wie ev. bei Basedow) oder ein allgemeines Absinken der Blutlipase (wie bei verschlechtertem Ernährungszustand) diagnostisch berücksichtigt werden, wenn es sich um einen grundsätzlich anderen Prozeß handelt, als bei Pankreaserkrankungen, Krebs usw.

Eine genaue Analyse des Milieus und des Pherons und eine Untersuchung der Dispersität des Symplex müßte eine Klärung dieser Fragen bringen. Diagnostisch wird immer nur wichtig sein, die Organspezifität zu erhöhen. Solange wir — wie jetzt — die Lipase nur an ihrer Wirkung erkennen können, darf man deshalb nicht etwa durch Reinigungsprozesse o. ä. eine Angleichung der verschiedenen Lipasen erzeugen, falls es sich nicht nur um unspezifische Aktivatorwirkung handelt. Später aber wird es vielleicht möglich sein, durch Analyse von Pheron, Milieu und Symplex die Lipase selbst zu erfassen und damit eine noch feinere Methodik in der Hand zu haben als in den jetzigen Verfahren zur Lipaseermittlung.

Zusammenfassung.

Es wird ein Einblick gegeben, wie sich die lipolytische Spaltfähigkeit des Blutes (Serums) bei Erkrankung gewisser Organe in ganz bestimmter, gewebsspezifischer Weise ändert. Ob es sich dabei um ein Übertreten von Organlipase handelt, ist nicht sicher. Eingehender wird die Diagnostik von Carzinom aus dem Serum besprochen.

Die Lipase im Blutserum kann nur an ihrer Wirkung erkannt werden. Bei der Spaltung von Tributyrin (und anderen Fetten) äußert sie sich durch das Auftreten von Fettsäure oder durch Änderung der Oberflächenspannung. Die Änderung der Oberflächenspannung kann im Wesentlichen mit dem stalagmometrischen, dem Blasendruck- und dem Abreißverfahren bestimmt werden; das Auftreten von Fettsäure ist durch Titration der Gasanalyse zu ermitteln. Beim Vergleich der einzelnen Methoden erscheinen für diagnostische Zwecke vor allem das stalagmometrische und das gasanalytische Verfahren geeignet; letzteres ist genauer, aber diffiziler. Am handlichsten ist die Abreißmethode mit der Torsionswaage, doch läßt sie sich zur Bestimmung der Serumlipase vorläufig noch nicht verwenden.

Zum Schluß wird neben Allgemein-Methodischem ein kurzer Überblick über das gegeben, was wir heute von Wirkungsweise und Struktur der Lipase wissen und welche Verbesserungen unserer diagnostischen Verfahren daraus zu erwarten sind.

Literatur.

Abderhalden, Rona: Z. physiol. Chem. 75, 345 (1911).
Acqua, O. dell, Strauß: Klin. Wschr. 1933, 1935.
Ascoli, M.: Klin. Wschr. 45, 1935, 1593.
Avellone, L.: Riv. Pat. Sper. 1, 385.
Bach, E.: Arch. exp. Path. 165, 614 (1932).
Bamann, Schmeller: Z. physiol. Chem. 194, 1 (1931).
Barth, F.: Bioch. Z. 270, 63 (1934).
Bauer, J.: Klin. Wschr. 1933, 1933.
Bernhard, Fr.: Z. f. Krebsforsch. 38, 450 (1933).
— Klin. Wschr. 25, 1085 (1932).
Bernhard, Fr., Köhler: Dtsch. Z. f. Chir. 248, 72 (1936).
Bing, M., Marangos: Bruns Beitr. z. klin. Chir.
Bringmann: Dtsch. Z. f. Chir. 185, 211.
Brinkmann, van Dam: Münch. med. Wschr. 48, 1550 (1921).
Bröckmeyer: Klin. Wschr. 1924, 20 und 24.
Büchler, P.: Monatsschr. Psych. Neur. 57, 127 (1934).
Clauser, F.: Riv. ital. gin. 3, 83 (1924).
Czapek, F.: Ber. Bot. Ges. 28, 480.
— Über eine Meth. z. dir. Best. d. Oberflsp. G. Fischer, Jena, 1911.
Davidsohn, H.: Bioch. Z. 31, 345 (1911).
— Bioch. Z. 49, 249 (1913).
Dörle, M., Weiß: Bioch. Z. 167, 395 (1926).
Dreyfuß, Roseno: Arch. klin. Chir. 150, 78 (1928).
Dyckerhoff, Miehler, Tadsen: Bioch. Z. 268, 17 (1933).
Ehrmann: Z. ärztl. Fortbild. 12, 384 (1929).
Fiessinger,N.: Ann. de Med. 34, 101 (1933).
Fodor, A.: Das Fermentproblem, Dresden 1922.
Franzesco, S. di: Fol. gyn. 23, 121 (1926).
Freund: Intern. Congr. med. London 1919.
Freundlich, H.: Kapillarchemie 1909.
Gruzewska, Z., Roussel: Ann. de physiol. 9, 369 (1933).
Guszich, A.: Bruns Beitr. z. kln. Chir. 162, 256 (1935).
Guye, Perrot: Arch. d. scienc. nat. et phys., Genf 15, 13 (1903).
Gyotoku, K.: Journ. of biol. Chem. 217, 279 (1930).
Hari: Lehrbuch der physiol. Chemie.
Hercik: Die Oberflächenspannung.
Herrmann, E., Kornfeld: Arch. f. innere Med. 12, 469 (1936).
Introzzi, P.: Boll. Soc. Med. Chir. Pavia 5, 853 (1928).
Jorns, G.: Arch. klin. Chir. 172, 781 (1933).
Junker, Fr. H.: Dissert. Gießen 1935.
Katsch: Klin. Wschr. 1925, 384.
Kraut, H., v. Pantschenko-Jurewicz: Bioch. Z. 275, 114 (1934).
Köhler, K.: Z. f. Krebsforschung 43, 87 (1935).
— Ergebnisse der Enzymforschung. 1937. 6.

Kunos, Ger(ö: Klin. Wschr. 28, 1316 (1931).
Lenard, P., v. Dallwitz, Wegener, Zachmann: Ann. der Physik 74, 13 (1924).
Lewis: Bioch. Z. 18 (1924).
Loevenhart, Peirce: Z. of biol. Chem. 2, 1907.
Lohnstein, Th.: Z. phys. Chem. 10, 504.
Lowe, C.: Z. Stat. Med. 42, 444 (1934).
Lüdy, E.: Arch. f. exp. Pathol. und Pharm. 25, 347 (1899).
Macco, G. di: Riv. Pat. Sper. 5, 306 (1930).
Magnus, R.: Z. f. physiol. Chem. 42, 148 (1904).
Michaelis, Rona: Praktikum der physik. Chemie. 4. Aufl. 1930.
Mizuhara, S.: Ber. ges. Phys. 38, 290 (1927).
Mühlbock, Kaufmann: Bioch. Z. 1931.
Nitzulescu, J.: Soc. Biol. 114, 747 (1933).
Nordmann: Zbl. Chir. 44, 2783 (1929).
Oppenheimer: Lehrbuch der Enzyme. Verl. Georg Thieme, Leipzig 1927.
— Die Fermente und ihre Wirkungen. Verl. Dr. Jung 1936.
Oppenheimer, Pinkussen: Die Methodik der Fermente.
Ostwald, Luther: Physikochem. Messungen. 3. Aufl. 1920.
Pazzi Demurtas: Bioch. Ter. Sper. 17, 33, 402 (1930).
Petow, Schreiber: Klin. Wschr. 1923, 1248.
Pincussen, L., Takuma: Bioch. Z. 223, 341 (1930).
Remesow, J.: Arch. phys. 221, 533 (1929).
— Z. exp. Med. 87, 613 (1933).
Rona, P.: Bioch. Z. 32, 482 (1911).
Rona, P., Michaelis: Bioch. Z. 31, 345 (1911).
Rona, P., Bach: Bioch. Z. 111, 166 (1920).
Rona, P., Petow, Schreiber: Bioch. Z. 2366 (1922).
Rona, P., Pavlovic: Bioch. Z. 134, 108 (1923).
Rona, P., Takata: Bioch. Z. 134, 118 (1923).
Rona, P., Petow: Bioch. Z. 146, 144 (1924).
Rona, P.: Klin. Wschr. 1922.
Roseno: Klin. Wschr. 1928, 1639.
Rußnyak, St.: Bioch. Z. 133, 359 (1923).
Sauer: Bioch. Z. 158, 335 (1926).
Saxl: Bioch. Z. 12, 343 (1908).
Sereni, E.: Arch. di Fis. 21, 501 (1923).
Schmidt, K.: Arch. klin. Chir. 174, 510 (1933).
Shaw, Mackenzie: Intern. Z. Med. 42, 23 (1929).
Sieber, N.: Z. f. physiol. Chem. 45, 177 (1908).
Simon: Klin. Wschr. 48, 2298 (1925).
— Klin. Wschr. 1926, 2443.
Steudel, H.: Bioch. Z. 263, 231 (1933).
— Bioch. Z. 269, 175 (1934).
Tominga, T.: Bioch. Z. 140, 230, 248 (1923).
Tscheboksaro, M., Malkin: Klin. Wschr. 1927, 1472.
Traube, J.: Z. prakt. Chem. N. F. 34, 305 (1896).
— Bioch. Z. 5, 1358.
— Bioch. Z. 130, 476 (1922).
— Bioch. Z. 120, 106 (1921).
Virtanen: Z. phys. Chem. 219, 1 (1933).
Waldschmidt-Leitz, Junowitz: Bioch. Z. 268, 178 (1934).
Warburg: Bioch. Z. 100, 230 (1919).
— Bioch. Z. 142, 315 (1923).
— Bioch. Z. 152, 51 (1924).
Watermann: Z. f. Krebsforschung 34, 313 (1931).

Weinberg, B.: Z. phys. Chem. 10, 34.
Wildegans: Chir. 1, 721 (1929).
Willstätter: Z. physiol. Chem.
Willstätter, Memmen, Waldschmidt-Leitz: Z. physiol. Chem. 125, 93 (1923).
— Z. physiol. Chem. 125, 132 (1923).
Willstätter, Memmen: Z. physiol. Chem. 129, 1 (1923).
— Z. physiol. Chem. 133, 229 (1924).
— Z. physiol. Chem. 133, 247 (1924).
— Z. physiol. Chem. 138, 216 (1924).
Willstätter, Memmen, Hanrowitz: Z. physiol. Chem. 140, 203 (1924).
Willstätter, Kumagava: Z. physiol. Chem. 146, 151 (1925).
Willstätter, Kuhn, Lind, Memmen: Z. physiol. Chem. 167, 303 (1927).
Willstätter, Rohdewald: Z. physiol. Chem. 203, 209 (1931).
— Z. physiol. Chem. 229, 241 (1934).

Lebenslauf.

Am 15. März 1911 wurde ich in Bülowsheide (Westpreußen) geboren, wo mein Vater als preußischer Staatsforstmeister tätig war. Von Ostern 1917 bis Herbst 1919 besuchte ich die dortige Volksschule, nach meines Vaters Versetzung zunächst die Henkelsche Vorschule in Kassel, von Ostern 1921 bis Ostern 1930 das Friedrichsgymnasium zu Kassel. Nach dem Abitur studierte ich zunächst Naturwissenschaften, später Medizin in Marburg, Wien, Königsberg, Jena und Gießen. Die beiden ärztlichen Vorprüfungen legte ich in Marburg ab, das Staatsexamen am 5. Dezember 1936 in Gießen. Sämtliche medizinische Examina bestand ich mit der Note „sehr gut". Als Medizinalpraktikant war ich vom 15. Dezember 1936 bis zum 31. Januar 1937 am Krankenhaus Rotes Kreuz (chirurgische Abteilung) tätig, seit dem 1. Februar 1937 bin ich am Pathologischen Universitätsinstitut Marburg und nahm vom 2. bis 29. Mai an einem Jungärztelehrgang in der Führerschule der deutschen Ärzteschaft Alt-Rehse teil. Nach fünfmonatiger Tätigkeit in der Universitätsklinik für Innere Medizin in Marburg trat ich am 15. Dezember 1937 als Jungarzt beim Amt für Volksgesundheit in Kassel ein.

Meine akademischen Lehrer waren: Professor Dr. Alverdes, Arold, Aßmann, Berblinger, Bernhard, Biebl, Brüggemann, Bruns, Büttner, Claußen, Dabelow, Dittler, Duken, A. W. Fischer, Fischl, Frick, Furtwängler, Gaulhover, Göppert, Grüneisen, Guleke, Hasse, Heilmeyer, Herzog, Hildebrandt, Jaeck, Jäger, Jakobshagen, v. Jaschke, Kayserling, Kliewe, Kutscher, Läwen, Meerwein, Mikulicz-Radetzky, Patzelt, Pitzen, Reinwein, Riehm, Rossenbeck, Schaffer, Schopper, Schultze, Schumacher, Seidel, Seiser, Tandler, Veil, Wetzel.

Marburg, den 27. Juli 1937.

Wilhelm Nordeck.